

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
Факултет медицина
Катедра по микробиология и вирусология

Д-р МИЛЕНА КРАСИМИРОВА БОЖКОВА

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ
ЕПИДЕМИОЛОГИЯТА И РЕЗИСТЕНТНОСТТА
КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ
СРЕДСТВА В КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ**

Stenotrophomonas maltophilia

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ
Микробиология 01.06.12

Научени ръководители
Доц. д-р Теменуга Стоева, д.м.
Чл. Кор. Проф. д-р Иван Митов, д.м.н.

Варна, 2016

Дисертационният труд съдържа 140 страници и е онагледен с 12 фигури и 19 таблици. Цитирани са 229 литературни източници, от които 7 на кирилица и 226 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедра по микробиология и вирусология на МУ- Варна и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

Проф. д-р Тодор Кантарджиев, д.м.н

Проф. д-р Мария Средкова, д.м.н.

Проф. д-р Ива Христова, д.м.н

Доц. д-р Стефана Събчева, д.м.н.

Доц. д-р Теменуга Стоева, д.м.

Дисертантът работи като асистент в Катедра по микробиология и вирусология на МУ – Варна и като лекар в лаборатория по клинична микробиология на УМБАЛ „Света Марина” - Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 30.09.2016г. от 11 часа.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на МУ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
1. УВОД.....	7
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	12
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	13
3.1. Изолати <i>S. maltophilia</i>	13
3.2. Методи за идентификация на <i>S. maltophilia</i>	13
3.3. Методи за изпитване на чувствителността на <i>S. maltophilia</i> към антимикробни лекарствени средства.....	14
3.4. Фенотипни методи за детекция на бета - лактамази	16
3.5. Молекулярно - генетични методи за детекция на гени, кодиращи резистентност.....	17
3.6. Методи за епидемиологично типирание на <i>S. maltophilia</i>	17
3.7. Статистически методи.....	17
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	18
Епидемиологична информация	18
Идентификация.....	25
Определяне чувствителността на изпитваните изолати <i>S. maltophilia</i> към антимикробни лекарствени средства.	27
Резултати от съпоставянето на трите метода за определяне на чувствителност към антибактериални средства	28
Резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole.....	35
Резистентност към хинолони (ciprofloxacin и levofloxacin).....	37
Резистентност към ceftazidime	39
Резистентност към ticarcillin / clavulanic acid	40
Резистентност към полимиксини (colistin, polymyxin B)	40
Резистентност към тетрациклини и глицилциклини (doxycycline, tigecycline).....	42
Резистентност към chloramphenicol.....	43
Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на респираторни изолати <i>S. maltophilia</i>	45

Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на изолати <i>S. maltophilia</i> от пациенти с муковисцидоза	46
Чувствителност към антимикробни лекарствени препарати на изолатите <i>S. maltophilia</i> от интензивни и не-интензивни клиници.....	48
Чувствителност към антимикробни лекарствени препарати на изолатите <i>S. maltophilia</i> , устойчиви към trimethoprim/sulfamethoxazole. ...	49
Определяне на ефекта от комбинираното въздействие на антибактериални препарати върху клинични изолати <i>S. maltophilia</i> чрез Е тест.	50
Детекция на широкоспектърни бета лактамази чрез фенотипни методи: двойно – дисков тест за синергизъм.	55
Изоелектрично фокусиране (IEF) и биологичен тест за бета - лактамна хидролитична активност (Bioassay).	56
Детекция на гени, кодиращи резистентност към β – лактами: полимераза - верижна реакция (PCR) за детекция на гени, кодиращи ESBLs – CTX - M, SHV и TEM тип.	57
Детекция на гени, кодиращи резистентност към trimethoprim/ sulfamethoxazole : полимераза - верижна реакция (PCR) за детекция на <i>sul</i> гени	58
Епидемиологичното типичане чрез случайно амплифициране на полиморфна ДНК – RAPD PCR (Random amplified polymorphic DNA).....	61
Епидемиологично типичане на изолатите <i>S. maltophilia</i> от УМБАЛ „Света Марина”, СБАГАЛ „Проф. Д-р Д. Стаматов” и МБАЛ „Света Анна” - Варна.	61
Епидемиологично типичане на изолатите от УМБАЛ „Георги Странски” - Плевен.	68
5. ИЗВОДИ.....	73
6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	75
Приноси с оригинален характер	75
Приноси с потвърдителен характер	75
Приноси с научно - приложен характер	75
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	76
Публикации в научни списания.....	76
Съобщения, изнесени на научни форуми.....	76

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДДМ	- Дисково дифузионен метод
КАИЛ	- Клиника по анестезиология и интензивно лечение
МПК	- Минимална потискаща концентрация
МБК	- Минимална бактерицидна концентрация
НФГБ	- Неферментиращи глюкозата бактерии
САРИЛ	- Сектор по анестезиология и интензивно лечение
BSAC	- Британско общество по антимикробна химиотерапия
CLSI	- Институт за клинични лабораторни стандарти
CDC	- Център за контрол на заболяванията
DDST	- Двойно – дисков тест за синергизъм
ECDC	- Европейски център за превенция и контрол на заболяванията
EMA	- Европейска медицинска агенция
ESBLs	- Широкоспектърни β -лактамази
EUCAST	- Европейски комитет за определяне на чувствителността към антимикробни препарати
<i>gyr B</i>	- Ген, кодиращ субединица В на ензима гираза
IEF	- Изоелектрично фокусиране
IS	- Инсерционна последователност
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> карбапенемаза
MDR	- Множествено резистентен
PCR	- Полимеразо – верижна реакция
PFGE	- Електрофореза в пулсиращо електрофоретично поле
RAPD-PCR	- Случайна амплификация на полиморфна ДНК посредством полимеразо – верижна реакция
XDR	- Екстензивно резистентен
VAP	- Вентилаторно – асоциирана пневмония
WHO	- Световна Здравна Организация
CAZ	- ceftazidime
CHL	- chloramphenicol
CIP	- ciprofloxacin
COL	- colistin
LVX	- levofloxacin
PolB	- polymyxin B
SXT	- trimethoprim/sulfamethoxazole
TGC	- tigecycline
TTC	- ticarcillin/clavulanic acid

1. УВОД

През последните десетилетия спектърът на инфекциозните агенти, предизвикващи заболявания в условията на болничната среда се променя. Нарастването на относителния дял на тежките вътреболнични инфекции, причинявани от опортюнистични патогени от групата на неферментиращите глюкоза Грам-отрицателни бактерии в момента представлява сериозен медицински и социален проблем. Устойчивите тенденции за увеличаване на антибиотичната резистентност сред тях е сред основните предизвикателства пред световната медицинска общност, като те са фокус на редица проучвания, целящи ограничаването на проблема и търсенето на нови подходи за лечение на инфекции, причинени от тези бактерии.

Към групата на неферментиращите глюкоза Грам - отрицателни бактерии се отнася и *Stenotrophomonas maltophilia*. Той е типичен опортюнистичен патоген, широко разпространен в природата и нерядко изолиран в болничната среда. Въпреки че традиционно е възприеман като бактериален вид с ниска степен на вирулентност, днес е ясно, че при определени обстоятелства той е способен да причини сериозни, включително инвазивни заболявания. В имунокомпрометирани индивиди и пациенти в критично състояние той може да причини разнообразни в клиничната си презентация инфекции, вариращи значително по степен на тежест. Най - честата клиничната проява на *S. maltophilia* са бронхо-пулмоналните инфекции – основно пневмонии, асоциирани с апаратна вентилация (VAP), инфекции при пациенти с муковисцидоза и такива с други подлежащи заболявания на респираторния тракт. Освен тях, нерядко се доказват бактериемии, уроинфекции, раневи инфекции, очни инфекции, инфекции на централната нервна система и др.

Напоследък заболяванията, причинени от *S. maltophilia* попадат във фокуса на организации, ангажирани с опазването на общественото здраве като WHO. Понастоящем WHO отбелязва факта, че през последните десетилетия много патогенни видове са развили резистентност към един или няколко антимикробни лекарствени препарати и включва *Stenotrophomonas maltophilia* в групата микроорганизми, чиято резистентност е от първостепенно значение за общественото здраве. Отредено му е място сред най – проблемните за лечение вътреболнични

патогени наред с *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, множествено - устойчивите чревни патогени, като *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, продуциращи широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs) и KPC ензими, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Масштабни изследвания сочат, че честотата на причиняваните от *Stenotrophomonas maltophilia* инфекции през последните години постоянно нараства. Тази тенденция е особено изразена сред рисковите групи пациенти - имунокомпрометирани индивиди (включително пациенти с HIV или неопластични заболявания) и такива с тежки хронични заболявания (напр. муковисцидоза). Ретроспективно проучване във Великобритания върху етиологичния спектър на бактериалните патогени при пациенти с муковисцидоза, обхващащо двадесетгодишен период (1985 - 2005г.) установява сигнификантно четирикратно нарастване на колонизираните със *Stenotrophomonas maltophilia* пациенти. През 2012 г. мащабно проучване за мониторинг на антимикробната резистентност посочва *S. maltophilia* като един от четирите водещи патогена, асоциирани с интраабдоминални инфекции в азиатско-тихоокеанския регион. Значимо увеличение е установено и по отношение на останалите групи заболявания, причинени от *S. maltophilia*, като се счита че понастоящем заема трето място сред стриктно аеробните Грам – отрицателни бактерии по честота на изолиране от клинични материали след *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*.

По - голямата част от причиняваните от вида заболявания са типични нозокомиални инфекции и се регистрират предимно в отделенията за интензивно лечение. По данни от проспективно проучване на най - честите патогени в отделенията за интензивно лечение в Канада за периода 2005 - 2006г., *S. maltophilia* заема единадесето място по честота на изолиране от всички клинични материали, като заедно с *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter cloacae* и *Serratia marcescens* е сред най-често изолираните Грам - отрицателни микроорганизми. Заболявания, придобити в обществото се установяват също, макар и по-рядко.

През последните години интерес представлява изясняването на точните механизми на вътреболнично разпространение на *S. maltophilia*. За тази цел се използват основно молекулярно - генетични

методи. *S. maltophilia* притежава способността да се адаптира лесно към неблагоприятните условия и да оцелява в специфичните условия на болничната среда. Естествените му (вродени) механизми на устойчивост към антибиотици, тежки метали и дезинфектанти му осигуряват съществено предимство в хоспиталните екосистеми. Най - често селектиращите фактори като употреба на широкоспектърни антибиотици и агресивни дезинфекционни режими се установяват в звената за интензивна терапия и поради това тези структури са обичайното място на разпространение на *S. maltophilia* в болничната среда.

Получените до момента данни за вътреболничното разпространение на *S. maltophilia* не са еднозначни. Повечето от проучванията върху вътреболнични изолати установяват значимо генетично разнообразие и значително по-рядко - епидемично разпространение на клонално свързани изолати в болничната среда. От важно значение за превенцията на асоциираните с този бактериален вид инфекции е установяването на техния източник и конкретните механизми на трансмисия.

Изключително ограниченият избор на подходящо лечение за пациентите поради вродената устойчивост на *S. maltophilia* към повечето от често използваните антимикробни лекарствени препарати, отнежда на проблема за лечението на асоциираните с този бактериален вид инфекции сериозно място в съвременната медицинска практика. С най - голямо клинично значение е първичната резистентност към повечето препарати от групата на бета – лактамните антибиотици поради наличието на два индуцибелни хромозомно - кодирани ензима с бета - лактамна активност – L1 и L2. От важно значение е също и вродената резистентност към аминогликозидните антибиотици, първогенерационните хинолони, trimethoprim и др. Освен тези видовоспецифични вродени механизми на резистентност, допълнителен проблем представлява придобитата устойчивост към ограничения брой препарати с добра активност срещу *S. maltophilia* - trimethoprim/sulfamethoxazole, флуорохинолоните, тетра - и глицилциклините и др. Познаването на точните механизми на резистентност към тези антибактериални препарати е от ключово значение за избора на подходяща терапия при *S. maltophillia* - асоциирани заболявания.

Традиционно за средство на първи избор при лечение на *S. maltophilia* асоциираните заболявания се сочи комбинирания препарат trimethoprim/sulfamethoxazole. Повечето проучвания съобщават за

високи нива на чувствителност към този антимикробен агент, поради което той обикновено е препоръчван за емпирично лечение, прилаган самостоятелно като монотерапия или в комбинация с други антибиотици. През последните години обаче в много региони по света, включително и у нас се наблюдава изразена в различна степен тенденция към редуциране на чувствителността, което налага търсене на нови подходящи алтернативи.

Често прилаган подход в лечението на заболявания, причинени от полирезистентни бактериални видове (включително *S. maltophilia*) е комбинираното приложение на антибактериални средства. Една от основните цели на подобни комбинации е осигуряването на синергистично *in vivo* взаимодействие с цел ерадикация на полирезистентните патогени. В лабораторната практика има въведени различни методи за установяването на ефекта от антибиотичните комбинации. Единно е мнението, че лабораторното *in vitro* установяване на антибиотичното взаимодействие не винаги точно отразява реалния *in vivo* клиничен ефект. Все пак доминира схващането, че при избора на подходяща антибиотична комбинация е уместно при възможност тя да се съобрази с лабораторно установените феномени на синергизъм, адитивност, индиферентност или антагонизъм.

Липсата на ясни критерии за изпитването на чувствителността на *S. maltophilia* към антимикробни лекарствени средства представлява допълнително затруднение в ежедневната лабораторна дейност. Отсъствието на единен стандарт за изпитване на чувствителността към антибиотици и явните противоречия между широко възприети стандарти като EUCAST и CLSI създават затруднения при интерпретиране на профила на резистентност на този бактериален вид. Не на последно място, отсъствието на точна корелация между лабораторно установената чувствителност и клиничния ефект от провежданото лечение затруднява в голяма степен коректния избор на подходящ антибактериален агент.

Разширяването на познанията за вътреболничната епидемиология на *S. maltophilia* е едно от най-важните условия за контрол и превенция на причиняваните от този вид заболявания при хоспитализирани пациенти. Натрупването на богата база данни за *in vitro* чувствителността му към антибактериални лекарствени средства, точните механизми на резистентност към тях и потенциалните ефекти при комбинираното им приложение съществено би подобрило шансовете за терапевтичен успех.

Експерименталната работа е извършена в Катедра „Микробиология и Вирусология” при МУ - Варна, УМБАЛ „Света Марина” - Варна и Катедра „Медицинска Микробиология” при МУ - София. Всички молекулярно - генетични изследвания са извършени в Катедра „Медицинска Микробиология” при МУ - София. В процеса на работа получихме ценна методична и практическа помощ от колегите, работещи в съответните звена, за което им изказваме най-искрената си благодарност.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.

Цел на настоящата работа: **Микробиологични и молекулярно - генетични проучвания върху епидемиологията и резистентността към антимикробни лекарствени средства в клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*.**

Във връзка с това си поставихме следните задачи:

1. Да се проведе сравнително проучване на класическите и апаратните методи за идентификация на *Stenotrophomonas maltophilia*.
2. Да се определи и анализира чувствителността на клиничните изолати *Stenotrophomonas maltophilia* към набор от антимикробни лекарствени средства.
3. Да се проучи и оцени ефекта от комбинираното приложение на антибактериални препарати върху клиничните изолати *Stenotrophomonas maltophilia*.
4. Чрез фенотипни и молекулярно - генетични методи да се проучи разпространението на гени, кодиращи бета - лактамази сред изолатите *Stenotrophomonas maltophilia*.
5. Чрез молекулярно - генетични методи да се проучат механизмите на резистентност към антибактериалния препарат trimethoprim/sulfamethoxazole, сочен за средство на избор при лечение на *Stenotrophomonas maltophilia* - асоциирани заболявания.
6. Да се извърши епидемиологично типизиране на изолатите *Stenotrophomonas maltophilia*.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Изолати *S. maltophilia*.

Общият брой на проучените изолати *S. maltophilia* е 168.

Клинични изолати *S. maltophilia*

В настоящото проучване са включени общо 166 клинични изолата *S. maltophilia*, изолирани от 163 различни пациенти в два клинични центъра в България - Варна и Плевен. Трима пациенти са представени с по два изолата *S. maltophilia*. В тези случаи критерий за включването на допълнителен изолат е изолиране на втория щам в интервал от 14 или повече дни от първия. Изолатите от Варна (общо 132) бяха изолирани от три болници – УМБАЛ „Света Марина - 123, СБАЛАГ „Проф. Д-р Д. Стаматов” - 6 и МБАЛ ” Света Анна”- 3.

Изолатите от клиничен център Плевен (n=34) бяха изолирани в УМБАЛ “Д-р Георги Странски“. Периодът на изолиране на включените в проучването изолати е осем години от 2007 до 2015 г.

Изолати *S. maltophilia* от болнична среда и болничен персонал

Проучени бяха два изолата *S. maltophilia* от болнична среда, изолирани в УМБАЛ „Света Марина”, Варна - един от вода в овлажнителна система от интензивно детско отделение (ИДО) и един - от ръце на болничен персонал от Клиника по анестезиология и интензивна терапия (КАИЛ) на същата болница.

3.2. Методи за идентификация на *S. maltophilia*

3.2.1. Конвенционални фенотипни методи

Всички 168 изолата бяха първоначално идентифицирани с конвенционални тестове. За видова идентификация на *S. maltophilia* прилагаме схема, базирана на определяне на Грамовата принадлежност, основните морфологични и културелни характеристики и седем биохимични теста (оксидация на глюкоза, образуване на азот от нитрити, растеж в анаеробни условия в присъствие на нитрати, флуоресценция, желатиназа, подвижност и оксидазна активност), четири от които се извършват в политропната среда на Sellers.

3.2.2. Идентификация чрез полуавтоматизирана система Crystal E/NF (Becton Dickinson).

Системата Crystal E/NF бе използвана като потвърдителен метод при всички 168 изолата, първоначално идентифицирани като *S. maltophilia* по конвенционалните методи. Системата разполага с набор от 30 хромогенни биохимични теста за ферментация, оксидация, деградация и хидролиза на различни хромогенни субстрати в панела и изисква допълнително тестване за оксидазна активност и продукция на индол.

3.2.3. Идентификация чрез автоматизирана система Phoenix 100 (Becton Dickinson)

За идентификацията на 31 клинични изолата бе използвана автоматизираната система Phoenix 100. Панелите NMIC/ID на Phoenix 100 идентифицират 161 различни бактериални Грам отрицателни вида, които съставляват повечето от клинично значимите Грам - отрицателни стриктно аеробни и факултативно анаеробни бактерии. Идентификацията се основава на метаболитната активност на тестваните бактериални видове, като всеки панел съдържа 45 микроямки с изсушени лиофилизирани биохимични субстрата и 2 ямки за контрол на флуоресценцията. В панелите има 16 ензимни субстрата, 23 субстрата за източник на въглерод и 5 теста за утилизация и потискане на растежа.

3.3. Методи за изпитване на чувствителността на *S. maltophilia* към антимикробни лекарствени средства.

3.3.1. Дисково - дифузионен метод на Bauer – Kirby

Чувствителността на 96 изолата *S. maltophilia* към 10 антибактериални лекарствени препарата бе проучена чрез дисково - дифузионния метод на Bauer – Kirby според общоприетите стандарти.

Понастоящем в EUCAST има определени критерии за изпитване на чувствителността на *S. maltophilia* по дисково - дифузионния метод само за trimethoprim/sulfamethoxazole. За изпитване на чувствителността към препаратите levofloxacin, ciprofloxacin и ticarcillin/clavulanic acid, бяха използвани критериите на EUCAST, определени за *Pseudomonas* spp., а за chloramphenicol и tigecycline – тези, определени от същия стандарт за

семејство *Enterobacteriaceae*.

За интерпретиране на чувствителноста към doxycycline, ceftazidime и полимиксинови антибиотици (поради отсуствие на стандарти в EUCAST) бяха използвани тези на CLSI (M100-S25 2015) за семејство *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.2. Определяне на МПК чрез използване на Е - тест (Epsilonometer test)

Епсилотричниот тест бе приложен при 96 изолата *S. maltophilia*. За целта бяха използвани основно критериите на EUCAST (v.6.0, 2016г.) Този стандарти определя гранични стойности на МПК за *S. maltophilia* само за trimethoprim/sulfamethoxazole. За определяне чувствителноста към полимиксиновите антибиотици, ceftazidime, ciprofloxacin, levofloxacin и ticarcillin/clavulanic acid се приложиха граничните стойности, определени от същия стандарти за *Pseudomonas spp.*, а за chloramphenicol и tigecycline – тези, определени за семејство *Enterobacteriaceae*.

За интерпретиране на чувствителноста към doxycycline бяха използвани тези на CLSI 2015 за семејство *Enterobacteriaceae*.

3.3.3. Определяне на МПК чрез автоматизираната система Phoenix 100 ID/AST – панели NMIC/ID (Becton Dickinson)

При 31 клинични изолата *S. maltophilia* (всички с предварително определена чувствителност по метода на Bauer Kirby и епсилотричниот метод) се определи чувствителноста към антибактериални средства чрез метода на серийните разреждания в бульон. За целта бяха използвани панели NMIC/ID на автоматизираната система Phoenix 100.

За нуждите на настоящото проучване бяха отчитани МПК на 6 антибактериални препаратите: ceftazidime, ciprofloxacin, levofloxacin, colistin, ticarcillin/clavulanate и trimethoprim/sulfamethoxazole.

3.3.4. Определяне на ефекта от комбинираното прилагане на антибактериални препарати чрез Е – тест (White, 1996)

При 27 клинични изолата след предварително определяне на МПК чрез Е тест към 10 антибактериални препаратите, бе определен и ефекта от 5 антибиотични комбинации чрез Е тест базиран метод. Изолатите бяха

подбрани на базата на предварително установена резистентност към поне един от тестваните антибактериални агенти. Изпитаните антибиотични комбинации бяха следните:

- ticarcillin/clavulanic acid + trimethoprim/sulfamethoxazole
- levofloxacin + ceftazidime
- ciprofloxacin + tigecycline
- doxycycline + colistin
- chloramphenicol + polymyxin B

3.4. Фенотипни методи за детекция на бета - лактамази

3.4.1. Двойно – дисков тест за синергизъм за детекция на широкоспектърни бета – лактамази (Jarlier, 1988).

При 148 изолата бе проведен двойно – дисков тест за синергизъм с цел скрининг за продукция на широкоспектърни бета - лактамази. За теста се използваха следните антибиотични дискове: amoxicillin/ clavulanic acid (30 µg); ceftazidime (30 µg); cefotaxime (30 µg); aztreonam (30 µg) и cefepime (30 µg).

3.4.2. Изоелектрично фокусиране (IEF) за определяне групата на бета – лактамазите (Matthew, 1975) и Bioassay - биологичен тест за бета-лактамозна хидролитична активност (Bauernfeind, 1990)

IEF и Bioassay се приложи при общо 64 клинични изолата от двата клинични центъра, предварително определени като позитивни по двойно-дисковия тест за синергизъм. Изоелектричното фокусиране е високо чувствителен метод за определяне и характеризиране на протеини в зависимост от тяхната изоелектрична точка. Разделянето се извършва в полиакриламиден гел, съдържащ амфотерни молекули с ниска молекулна маса (амфолити), под действие на електрично поле. Използва се за доказване на бета-лактамази, които както всички протеини имат различно pH и съответно различна изоелектрична точка.

3.5. Молекулярно - генетични методи за детекция на гени, кодиращи резистентност.

3.5.1. Полимераза - верижна реакция (PCR) за доказване на гени, кодиращи продукцията на бета - лактамази от клас A (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX) (по Avison, 2000; Naiemi, 2006; Lavigne, 2008).

Групово специфична PCR за детекция на гени, кодиращи продукцията на широкоспектърни бета – лактамази (ESBL) от групите CTX, SHV и TEM бе приложена при 64 клинични изолата от двата клинични центъра, предварително установени като позитивни по двойно дисковия тест за синергизъм (DDST).

3.5.2. Полимераза - верижна реакция (PCR) за детекция на *sul* - 1 гени, кодиращи резистентност към trimethoprim/sulfametoxazole (Rosser, 1999).

PCR за детекция на *sul* гени бе проведена при 4 клинични изолата. Всички те бяха предварително определени като резистентни към trimethoprim/sulfametoxazole на базата на дисково-дифузионния тест, а впоследствие и при определяне на МПК чрез E - теста и по метода на серийните разреждания в бульон чрез автоматизираната система Phoenix.

3.6. Методи за епидемиологично типирание на *S. maltophilia*.

3.6.1. Случайно амплифициране на полиморфна ДНК – RAPD PCR - Random amplified polymorphic DNA (Yao, 1995).

Общо 148 изолата *S. maltophilia* от двата клинични центъра (включително двата изолата от болнична среда) бяха типирани с RAPD PCR.

3.7. Статистически методи

Използван беше алтернативен анализ при определяне структурата на изучавания признак (резистентност). При проверка на хипотези нивото на значимост на нулевата хипотеза беше определено според установената практика ($\alpha = 0.05$) чрез прилагане на t-теста (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/t-test.htm>).

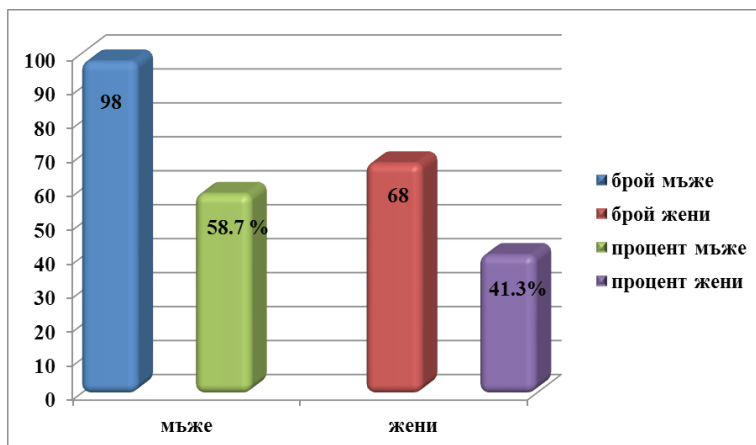
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Епидемиологична информация

Проучваните 166 клинични щама *S. maltophilia* са изолирани от пациенти, хоспитализирани в 4 болници (УМБАЛ „Св. Марина” – Варна, МБАЛ „Света Анна” – Варна, СБАЛАГ „Проф. Д-р Д. Стаматов” – Варна и УМБАЛ „Георги Странски” – Плевен).

Общо два изолата *S. maltophilia* бяха изолирани при санитарно – микробиологично изследване: единият бе от изследване на вода от овлажнителна система в интензивно детско отделение на УМБАЛ „Св. Марина” – Варна, а втория – от ръце на медицински персонал от КАИЛ на същото лечебно заведение.

Разпределението на пациентите по пол бе както следва: мъже – 98 (58.7%) и жени – 69 (41.3%). Данните са представени на фигура 1.



Фигура 1. Разпределение на пациентите, от които е изолиран *S. maltophilia* по пол в брой и процент.

Разпределението на пациентите, от които е изолиран *S. maltophilia* по възраст и вид клиника е представено на таблица 1. Възрастовият диапазон е в границата от 1 ден до 88 години.

Таблица 1. Разпределение на пациентите по възрастови групи (в брой и процент) и според вида на клиниките (интензивни и не-интензивни).

група	Възраст (години)	% от общия брой	Брой (%) от общия брой в съответната възрастова група				Съотношение ICU/ non - ICU
			общо	ICU	non - ICU	p-value	
1	0 - 1	15.1%	25	19 (76.0%)	6 (24.0%)	n.s.	3.17
2	1 - 17	11.4%	19	7 (36.84%)	12 (63.16%)	n.s.	0.58
3	18 - 60	30.1%	50	15 (30.0%)	35 (70.0%)	n.s.	0.42
4	Над 60	43.4%	72	25 (37.72%)	47 (62.28%)	<0.005	0.53
	общо	100%	166	66	100		1.21

Съкращения:

- **ICU** (Intensive Care Unit) – клиника за интензивно лечение
- **non-ICU** (Non- Intensive Care Unit) – клиника за не-интензивно лечение

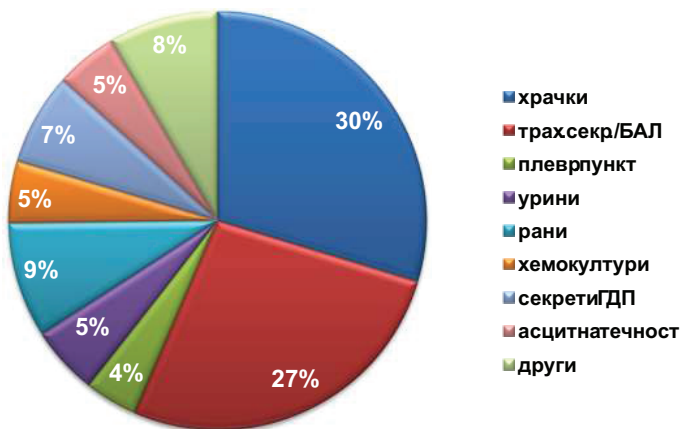
При съпоставянето на данните за изолируемостта на *S. maltophilia* в обособените четири възрастови групи (0 - 1г.; 1 - 17г.; 18 - 60г.; > 60г., таблица 1) се установи, че най - голямата част от изолатите са от пациенти над 60г. Макар в анализираният от нас данни да липсва точна информация за съпътстващите заболявания на пациентите, добре известен факт е, че с напредване на възрастта се увеличава честотата на тежките коморбидни състояния. Неопластичните и хронични заболявания на респираторния тракт (белодробен карцином, хронична обструктивна белодробна болест, бронхиектазна болест, белодробен емфизем, бронхиална астма) са най - чести именно в тази възрастова група, което вероятно е сред основните причини за установената от нас завишена честота на изолируемост на *S. maltophilia* в тази категория. При тези пациенти, преобладаващата част от клиничните изолати бяха установени сред такива, хоспитализирани в различни не - интензивни болнични структури, като различията бяха статистически достоверни ($p < 0.05$). Подобно разпределение (макар и статистически незначимо) се установи и в две от останалите три

възрастови групи (1 - 17г.; 18 - 60г). Единствено сред групата пациенти до 1 година се установи значителен превес на изолатите от интензивни болнични звена. Всички изолати *S. maltophilia* от интензивни клиники в тази възрастова група бяха установени в общо три интензивни клиники в три от болниците - интензивно детско отделение на УМБАЛ „Света Марина”- Варна и неонатологичните отделения на СБАЛАГ „Проф.д-р Д. Стаматов” - Варна и УМБАЛ „Георги Странски”- Плевен.

Разпространението на *S. maltophilia* в интензивни педиатрични и неонатологични болнични структури е било обект на няколко проучвания. През 2009г. Abasi и колектив съобщават за вътреболнично разпространение на респираторни изолати *S. maltophilia* в продължение на една и половина години в интензивно неонатологично отделение и идентифицират чрез PFGE два клона (А и В), като доказват и идентичен на клон А изолат от мивка за отпадни води. Авторите подчертават, че ерадикирането на подобни епидемични щамове е трудно при установена колонизация в определено клинично отделение.

През 2010 г. ретроспективно проучване, обхващащо петгодишен период (2003- 2008г.) представя данни за клиничните, бактериологичните и епидемиологичните характеристики на асоциираните със *S. maltophilia* инфекции в интензивно неонатологично отделение (140). Авторите установяват като основни рискови фактори за инфектиране със *S. maltophilia* продължителната хоспитализация и инвазивните процедури (механична вентилация, поставен уретрален или умбиликален катетър). Нашите данни потвърждават провеждането на механична вентилация като рисков фактор, тъй като една трета от изследваните клиничните материали са трахеални секрети от пациенти на механична вентилация.

Разпределението на изолатите *S. maltophilia* според вида на клиничните материали, от които са изолирани е представено на фигура 2.



Фигура 2. Разпределение на изолатите *S. maltophilia* според вида на клиничните материали, от които са изолирани (в %).

Сред най-често документираните инфекции, причинявани от *S. maltophilia* са тези на респираторния тракт. Благодарение на редица свои характеристики, този бактериален вид има характеристиките на типичен респираторен патоген. Спектърът на причиняваните от *S. maltophilia* респираторни инфекции е широк и включва редица разнообразни клинични синдроми. Сред най - тежките респираторни заболявания са нозокомиалните пневмонии, включително тези, асоциирани с механична вентилация - т. нар. **Ventilator Associated Pneumonia - VAP**. Сред изолатите, включени в настоящото проучване над половината са от трахеални аспирати и бронхо - алвеоларни лаважи от пациенти на механична вентилация, както и от храчки на хоспитализирани пациенти. Този висок относителен дял е закономерен предвид факта, че *S. maltophilia* е сред водещите бактериални видове, причиняващи нозокомиални пневмонии. Обобщени данни за периода 2009 - 2012г. от SENTRY - проучването на най-честите причинители на пневмонии в хоспитализирани пациенти показват, че *S. maltophilia* е на осмо място сред първите десет мониторираните бактериални вида, като заедно с *Acinetobacter* spp. причиняват 8 и 10.7% от вътреболничните пневмонии в САЩ и Европа, респективно. Проучването обхваща 12 851 бактериални изолати от общо 48 медицински центъра - 28 в САЩ и 20 - в Европейско – Средиземноморския регион

(включително Турция и Израел). Интересен е фактът, че сред патогените от САЩ *S. maltophilia* заема шестата позиция, „изпреварвайки” по честота *Acinetobacter* spp. Публикувано през 2015г. проучване на Fihman и колектив върху етиологичния спектър и чувствителността към антибиотици на най - честите причинители на VAP, представя данни за честотата на *S. maltophilia* в тази група пациенти. Анализът на резултатите показва, че в групата на Грам - отрицателните неферментативни бактерии, *S. maltophilia* е вторият по честота причинител на VAP след *P. aeruginosa*. Честотата на изолиране на представителите на групата на Грам - отрицателни неферментативни бактерии (с изключение на *P. aeruginosa*) показва статистически незначими вариации в проследявания период (2007-2011), като се движи в границите 0.34 - 2.67%. Във фокуса на това проучване е взаимовръзката между антибиотичната консумация и честотата на изолиране на определени бактериални видове. Авторите са документирали статистически достоверна позитивна корелация между завишената консумация на определени антибактериални агенти (вкл. флуорохинолони, цефалоспорины от трета и четвърта генерация и карбапенеми) и нарастване честотата на AmpC продуциращи *Enterobacteriaceae*. При *S. maltophilia* и останалите видове от групата на Грам-отрицателните неферментативни бактерии такава взаимовръзка не е установена.

Установените от нас седем изолати *S. maltophilia* от хракки на пациенти с муковисцидоза съставляват едва 4.22% от всички изследвани клинични изолати. *S. maltophilia* е един от често изолираните бактериални видове при пациенти с муковисцидоза. Някои проучвания съобщават за изразена тенденция към увеличаване честотата на *S. maltophilia* в тази група пациенти. Сред възможните обяснения за този тренд е широката употреба на антибактериални лекарствени средства (преди всичко такива с анти-псевдомонадна активност, заради високата честота и клинично значение на *P. aeruginosa*) при пациенти с муковисцидоза, която би могла да „селектира” *S. maltophilia* заради вродената му резистентност към някои от тези препарати. Поради малкия брой и относителен дял на изолатите *S. maltophilia* от пациенти с муковисцидоза, нашите данни не позволяват да бъде определена изразена тенденция в изолируемостта през годините.

Изолираните от хемокултури *S. maltophilia* са значително по-малко като брой и относителен дял (n=8; 4.82%) в сравнение с тези, изолирани

от респираторен тракт. В почти всички случаи обаче бактериемичните изолати са от пациенти, при които се установяват един или няколко рискови фактори за *S. maltophilia* – асоциирани заболявания. В два от тези случаи се касае за пациенти с онко-хематологични заболявания, един изолат е от пациент на хроничен диализа, а три от изолатите - от пациенти, хоспитализирани в клиника за интензивни грижи (интензивно неврологично и интензивно детско отделение на УМБАЛ „Св. Марина”, Варна).

S. maltophilia нерядко се асоциира с инфекции на кръвта при пациенти със злокачествени хематологични заболявания, като по данни от скорошно проспективно проучване е причинител на 1.3% от бактериемии в тази рискова група, по – често при пациенти с неутропения отколкото при не-неутропенични. Значението на *S. maltophilia* като причинител на бактериемии е предмет на проучване в проекта OASIS (In vitro prospective research on Antimicrobial Susceptibility of Invasive pathogenS), чийто основен фокус е етиологичния спектър и чувствителността към антимикробни лекарствени средства на изолати от хемокултури. Проектът има за цел да установи и съотношението на болнично - придобитите бактериемии (дефинирани като такива, настъпващи след 72-ия час след хоспитализация) и тези, придобити в обществото (настъпили до 72-ия час от хоспитализацията). Анализът на получените данни показва, че *S. maltophilia* е значително по-чест причинител на болнично-придобити бактериемии в сравнение с тези, придобити в обществото. В интензивните болнични структури и хирургичните клиники е доказан отчетлив превес на болнично-придобитите изолати *S. maltophilia* спрямо придобитите в обществото. Тези резултати потвърждават установената и от нас по - висока честота на асоциираните със *S. maltophilia* бактериемии в интензивните болнични звена.

Уроинфекциите са една от по - редките клинични прояви на *S. maltophilia*. В нашето проучване изолатите от урина са 9 и съставляват 5.3% от общия брой. Във всички тези случаи, *S. maltophilia* е изолиран като сигнификантна монобактериална бактериурия. Два от изследваните изолати в групата са от един пациент с хронична инфекция на базата на неоплазия на простатната жлеза и с траен уретрален катетър, изследван двукратно през едномесечен интервал. Персистирането на идентичен изолат *S. maltophilia* (потвърдено и от данните, получени от типичането

на изолатите) приехме като индикация за трайна колонизация със *S. maltophilia*. Преобладаващата част от изолатите *S. maltophilia* от урина са от пациенти от не-интензивни клиники. При половината пациенти установихме като рисков фактор обструкция в оттичането на урината поради простатна хиперплазия и наличие на постоянен катетър. Подобни фактори често се асоциират със завишен риск от колонизация и инфекция със *S. maltophilia*.

Изолатите *S. maltophilia* от рани произхождат преди всичко от хирургичните клиники в трите болнични заведения. Най-голямата част от тях (6 от общо 15 изолати) са от пациенти от Клиниките по гръдна и съдова хирургия на УМБАЛ"Св. Марина" - Варна. Значението на Грам - отрицателните неферментативни бактерии като причинители на раневи инфекции, включително инфекции на хирургичното място (SSI, Surgical Site Infections) е добре известно. От групата при този тип инфекции най - често се доказва *P. aeruginosa*. Относителният дял на *S. maltophilia* като причинител на SSI е незначителен в сравнение с *P. aeruginosa* и поради това този бактериален вид рядко се мониторира при проучвания на етиологичния спектър на причинителите на мекотъканны инфекции и SSI. Проспективното проучване на Mendez и колектив на рисковите фактори и етиологичния спектър на SSI, обхващащо 14 455 пациента от хирургични клиники за четиригодишен период, *S. maltophilia* асоциираните инфекции съставляват едва 0.4% от общия брой. При търсене на предполагаемите източници на инфекции, асоциирани с хирургична намеса следва да се обърне внимание на евентуалната контаминация на хирургичния инструментариум в хода на оперативната намеса. В наскоро публикувано мониторингово проучване на бактериалната флора, изолирана от хирургичен инструментариум, *S. maltophilia* е единствения идентифициран Грам - отрицателен пръчковиден бактерии (от общо четири бактериални вида), изолиран от инструментариум, използван за панкреатодуоденектомия. Авторите допускат вероятността контаминирания с бактериална флора инструментариум да бъде асоцииран с развитие на постоперативна SSI дори и при отсъствие на очевидна контаминация на хирургичното поле. Независимо от регулярните санитарно-микробиологични изследвания на хирургичен инструментариум, през проследявания от нас период в хирургичните клиники и операционните зали на УМБАЛ"Св. Марина" не е документирано изолиране на *S. maltophilia*.

В обобщение, анализът на данните за вътреболничното разпространение на *S. maltophilia* показват, че изолатите от пациенти до 1г. възраст са значително по-чести в интензивните болнични структури. В синхрон с данните от други проучвания установихме, че в спектъра на асоциираните с този бактериален вид заболявания отчетливо преобладават инфекциите на бронхо-пулмоналния тракт, с акцент върху пневмониите при пациенти на механична вентилация и екзацербациите при пациенти с муковисцидоза. Макар и по-редки, бактериемите много често се регистрират при пациенти с допълнителни рискови фактори като например малигнени хемопатии, хроничен диализ и др.

Идентификация

Използваните в рутинната ни лабораторна практика конвенционални тестове (препарат по Грам, оксидация на глюкоза, образуване на азот от нитрити, растеж в анаеробни условия в присъствие на нитрати, флуоресценция, желатиназа, подвижност и оксидазна активност) бяха първично приложени при всички 168 изолата и те бяха определени като *S. maltophilia*.

Впоследствие всички изолати бяха потвърдени като *S. maltophilia* след изпитване чрез системата Crystal E/NF (Becton Dickinson), като статистически обработената степен на достоверност на идентификацията с тази система варираше в границите 87 - 99%. При 31 изолати впоследствие идентификацията бе допълнително потвърдена и от автоматизираната система Phoenix NID (Becton Dickinson) със степен на достоверност 90 - 99%. Получените от нас резултати демонстрират практически пълна конкордантност на идентификацията, получена по трите алтернативни метода.

Добре известен факт е, че оксидазният тест е ключов в схемата на идентификацията на Грам - отрицателните неферментативни бактерии. Първоначалните схващания за *S. maltophilia* като оксидаза - негативен се оспорват от някои по-нови проучвания върху фенотипните характеристики на вида. Според Carmody и колектив не по-малко от 20% от изолатите *S. maltophilia* са оксидаза-позитивни, като авторите подчертават, че в тези случаи може да се стигне до погрешна видова идентификация, като най-често такива изолати биват определени като *Burkholderia* spp. Данните, получени от споменатото проучване обаче не се базират върху клинични

изолати от различни анатомични локализации (каквито са нашите материали), а са основно проблемни за идентифициране респираторни изолати от пациенти с муковисцидоза. Нашите данни сочат, че от всички изолати *S. maltophilia* оксидазния тест е позитивен едва при двадесет, съставляващи 11.9% от цялата колекция. Освен гореизложените причини за значителната разлика, други вероятни обяснения за подобни различия биха могли да бъдат различните реагенти, използвани за оксидазния тест и / или по-късното му отчитане.

Акуратността на идентифициране на *S. maltophilia* чрез системите Crystal и Phoenix е документирана многократно и от други автори при мащабни проучвания, като и двете системи са показали отлична идентификация (100%) на клинични изолати *S. maltophilia*. Все пак, следва да се отбележи факта, че тези проучвания не са видово ориентирани и включват малко на брой изолати *S. maltophilia*. От друга страна, в базата - данни на двете системи (както и при всички други мануални или автоматизирани системи за идентификация) *S. maltophilia* е единствения представител на рода, поради което не може напълно да се изключи вероятността за грешки при идентифициране на някои от другите таксономично и биохимично близки представители на род *Stenotrophomonas*. За по - прецизна диагностика могат да се използват някои от молекулярно - генетичните методи за видова идентификация като например PCR за доказване на гените, кодиращи консервативни генетични структури като 16S рРНК и гена, кодиращ В субединицата на ензима гираза – *gyrB*.

Едно от най - важните предимства на автоматизираната система Phoenix е възможността за коректна идентификация на видово ниво в много кратки срокове. Нашите данни показват, че средното необходимо време за идентификация на *S. maltophilia* е 2 часа и 30 минути. Бързата и акуратна идентификация е от съществено значение при пациенти със *S. maltophilia* асоциирани инфекции, тъй като тя позволява ранно прецизиране на възможностите за правилна антимикробна лекарствена терапия и е основание за елиминиране от терапевтичната схема на неактивните спрямо причинителя препарати.

Документираното от нас практически пълно съответствие на видовата идентификация при използването на трите алтернативни метода (конвенционални тестове, Crystal и Phoenix) сочат, че в реални лабораторни условия, прецизното определяне на представителите на вида *S. maltophilia*

е реално постижимо. Сред най-важните предимства на автоматизираната система Phoenix в сравнение с другите два метода са много кратките срокове за идентифициране, което носи важна допълнителна информация за избора на подходящо лечение.

Определяне чувствителността на изпитваните изолати

***S. maltophilia* към антимикробни лекарствени средства.**

При 96 изолата *S. maltophilia* първоначално чувствителността към десет антибактериални препарата бе тествана чрез дисково - дифузионния метод на Bauer – Kirby.

Подробните данни за чувствителността на изолатите са представени на таблица 2.

Таблица 2. Чувствителност на 96 изолата S. maltophilia към антибактериални лекарствени средства, определена чрез дисково - дифузионния тест на Bauer-Kirby в брой и %.

Антибактериален препарат	Брой изолати / %		
	S	I	R
SXT	92 / 95.84	-	4 / 4.16
CIP	74 / 77.08	12 / 12.5	10 / 10.42
LVX	87 / 90.63	3 / 3.12	6 / 6.25
DOX	90 / 93.76	2 / 2.08	4 / 4.16
TGC	85 / 88.54	9 / 9.38	2 / 2.08
Pol E (Col)	66 / 68.75	-	30 / 31.25
Pol B	81 / 84.38	-	15 / 15.62
CHL	72 / 75.00	-	24 / 25.00
CAZ	43 / 44.79	11 / 11.46	42 / 43.75
TIM	33 / 34.37	-	63 / 65.63

При всички 96 изолата, чиято антибиотична чувствителност първоначално бе определена чрез ДДМ, допълнително приложихме Е-тест с цел определяне на МПК. Обобщените данни от изпитването на чувствителността по Е тест – метода са представени в таблица 3.

Таблица 3. Чувствителност на 96 изолата S. maltophilia към антибактериални лекарствени средства, определена чрез Е - тест в брой и %.

		МПК50	МПК90	S	I	R
SXT	0.008→>32	0.8	2	92 / 95.84	-	4 / 4.16
CIP	0.25→>32	1.5	>32	60 / 62.5	10 / 10.42	26 / 27.08
LVX	0.064→>32	0.5	1.5	85 / 88.54	4 / 4.17	7 / 7.29
DOX	0.25→>256	1.5	4	89 / 92.71	2 / 2.08	5 / 5.21
TGC	0.023→4	0.75	1	94 / 97.92	-	2 / 2.08
Pol E	0.064→24	1	12	82 / 86.42	-	14 / 14.58
Pol B	0.064→12	0.75	4	86 / 89.58	-	10 / 10.42
CHL	2→ >256	12	64	43 / 44.79	-	53 / 55.21
CAZ	0.75→>256	4	>256	42 / 43.75	-	54 / 56.25
TIM	1.5→>256	96	>256	37 / 38.54	-	59 / 61.46

При 31 от 96-те клинични изолата, чиято чувствителност към всички десет изпитвани антимикубни препарата бе определена чрез дисково-дифузионния метод и Е-теста, допълнително определихме чувствителността към шест антимикубни лекарствени препарата и по метода на серийните разреждания в бульон чрез автоматизираната система Phoenix 100 (Becton Dickinson).

Получените МПК на тези антибиотици (ceftazidime, ciprofloxacin, levofloxacin, colistin, ticarcillin/clavulanic acid и trimethoprim/sulfamethoxazole) бяха интерпретирани според критериите на EUCAST (версия 6.0., валидна от 01.01.2016г.) и CLSI (M100 – S 25, 2015г.) и изолатите бяха дефинирани като чувствителни, с интермедиерна чувствителност или резистентни. Изборът на шамовете бе базиран на предварително установена чрез дисково - дифузионния тест и чрез Е-тест не-чувствителност (интермедиерност и/или резистентност) към един или повече от изпитваните антибактериални препарати. Тествани бяха и шамове с дискордантни (S-R, S-I, R-I) резултати, получени от двата метода – дисково-дифузионния и Е-теста.

Резултати от съпоставянето на трите метода за определяне на чувствителност към антибактериални средства

При общо 31 клинични изолата чувствителността към шест антибактериални средства бе изпитана чрез използването на трите алтернативни метода. Получените резултати са представени на таблица 4.

Таблица 4. Резултати от изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства на 31 изолата *S. maltophilia* чрез използване на ДДМ, Е - тест и метод на серийните разреждания чрез автоматизирана система Phoenix.

Щам№	SXT			CIP			LVX			COL			CAZ			TIM		
	ДДМ	E	Ph	ДДМ	E	Ph	ДДМ	E	Ph	ДДМ	E	Ph	ДДМ	E	Ph	ДДМ	E	Ph
3	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S
34	S	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
40	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	R	R	S	R	R
42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
43	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R
57	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
61	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
67	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
71	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
72	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
73	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
75	S	S	S	I	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
88	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
91	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	S	R	R
96	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S
107	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
108	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
109	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	I	S	R	R	R	R
110	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
135	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R
137	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
139	S	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
140	S	S	S	I	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R
141	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R
142	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	I	R	R	S	R	R
150	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
155	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S

За определянето на чувствителността към антибактериални лекарствени средства могат да бъдат използвани различни методи. Най-широко използван в ежедневната практика е ДДМ, който е стандартизиран и утвърден за не малка част от клинично значимите бактериални патогени. Макар да дава само „качествен“ (S, I, R) резултат, ДДМ е предпочитан най-вече заради простотата на изпълнение и ниската си цена. Алтернативи са методите, базирани на определяне на МПК – класическите методи на серийните разреждания в агар и бульон, определяни като референтни методи, а сравнително отскоро и епсилонметричния тест (Етест).

Коректното определяне на чувствителността към антибактериални лекарствени средства при *S. maltophilia* представлява сериозен проблем. Отскоро възприетия у нас европейски стандарт EUCAST определя гранични стойности за тестване на чувствителността единствено за trimethoprim/sulfamethoxazole (по дисково-дифузионния метод и чрез определяне на МПК). За нито един от останалите антимикробни препарати, демонстриращи *in vitro* активност спрямо този бактериален вид, няма точно определени гранични стойности в настоящата версия (v.6.0 валидна от 01.01.2016) на EUCAST. Това налага като възможна алтернатива гранични стойности, определени за други таксономично отдалечени бактериални видове, да бъдат използвани за интерпретиране на чувствителността на *S. maltophilia*, което би могло да рефлектира върху точността на проведените тестове. Независимо от тези основни проблеми обаче, валидността на всеки един от методите за определяне на чувствителността следва да бъде определена чрез сравнение с референтните методи на серийните разреждания.

Анализът на литературните данни показва, че определянето на чувствителността чрез автоматизираната система Phoenix, базирано на модификация на метода на серийните разреждания в бульон дава акуратни резултати и е в достатъчна степен съизмерима с референтните методи. Phoenix интерпретира чувствителността на изследваните изолати на базата на определяне на МПК, при използване на 5 двукратни серийни разреждания на съответните антибактериални препарати. Поради тези причини я възприехме като еталон за определянето на чувствителността на клиничните изолати *S. maltophilia* и на тази основа определихме акуратността на другите два използвани от нас метода – дисково-дифузионния и Е теста. За целта подбрахме 31 клинични изолати,

предварително определени като резистентни към поне един от изпитваните антибактериални препарати и / или такива с дискордантни резултати, получени от дисково - дифузионния метод и Е теста. Съизмеримостта на всеки един от двата теста (дисково-дифузионния метод и Е теста) с определения от нас за еталонен метод (автоматизираната система Phoenix), определена чрез честотата на големи, малки и много големи грешки / несъответствия (MD major discrepancy, mD minor discrepancy, VMD very major discrepancy), както и нивото на съответствие на интерпретативните категории (category agreement - CA) са представена на таблица 5.

Таблица 5. Сравнителна характеристика на ДДМ и Е теста с модифицирания метод на серийните разреждания в бульон на автоматизираната система Phoenix.

ДДМ				
	VMD	MD	mD	CA
SXT	0/0	0/0	0/0	31/100
CIP	5/35.7	0/0	4/12.9	22/71.0
LVX	1/16.6	1/ 4.0	0/0	29/93.5
COL	5/29.4	3/21.4	0/0	23/74.2
CAZ	2/10.5	1/8.3	5/16.1	23/74.2
TIM	9/50.0	0/0	0/0	21/67.7
Е тест				
	VMD	MD	mD	CA
SXT	0/0	0/0	0/0	31/100
CIP	0/0	0/0	2/6.5	29/93.5
LVX	0/0	0/0	3/9.7	28/90.3
COL	1/5.9	0/0	0/0	30/96.8
CAZ	1/5.3	0/0	0/0	29/93.5
TIM	1/5.6	5/16.1	0/0	25/80.6

Съгласно въведените от ISO стандарти, за приемливо ниво на акуратност на определен тест се счита ниво на CA $\geq 90\%$ и честота на несъответствията, съответно за VMD и MD $\leq 3\%$ и за MD и mD $\leq 7\%$. От анализа на получените данни се вижда, че единствено по отношение на trimethoprim/sulfamethoxazole, дисково-дифузионния метод демонстрира отлична точност и пълно съответствие със стандарта. При интерпретирането на получените за colistin резултати следва да се отбележи, че в стандартите, въведени от EUCAST не фигурират гранични стойности за интерпретиране на чувствителността по дисково-

дифузионния тест и поради тази причина представените данни са базирани на определените от CLSI стойности, което е и вероятното обяснение за високата честота на VMD и MD при съпоставяне с определения за референтен метод и използване на EUCAST - базираните критерии за интерпретиране на МПК. От друга страна, експертната система на Phoenix единствено отчита стойностите на МПК за colistin, (които впоследствие могат да бъдат категоризирани според критериите на EUCAST), но не предоставя интерпретиране на получения резултат, което прави определянето на СА условно. Сходни причини обуславят различията в двата метода при отчитане на чувствителността към ceftazidime. Определяне на чувствителността по дисково - дифузионния метод бе проведено при използване на препоръчаните от CLSI дискове ceftazidime с натовареност 30µg (препоръчаната от EUCAST натовареност е 10 µg) и поради тази причина получените резултати бяха интерпретирани по заложените в този стандарт критерии. Съотнасянето им към резултатите, получени чрез автоматизираната система (интерпретирани по EUCAST критериите) генерира много висок относителен дял на несъответствия и съответно определи теста като незадоволително акуратен.

При определяне чувствителността към levofloxacin чрез дисково - дифузионния тест като цяло се установи приемливо високо ниво на СА над 90%, но заради наличие на един единствен изолат, погрешно определен като фалшиво - чувствителен, резултатите сочат неприемливост на теста заради относително висока честота на VMD (16.6%).

В най - голяма степен дискордантни резултати бяха получени при определяне чувствителността към ticarcillin / clavulanic acid, където се установиха 9 фалшиво чувствителни изолати, при общо 18 определени като резистентни по еталонния метод, което определи 50.0% честота на VMD. Тази находка, заедно с много ниското ниво на СА категорично демонстрират невъзможността на дисково-дифузионния тест точно да определи чувствителността към ticarcillin / clavulanic acid.

Епсилотричния тест също демонстрира отлична корелация с Phoenix по отношение чувствителността на клиничните изолати *S. maltophilia* към trimethoprim/sulfamethoxazole. При всички останали препарати (с изключение на ticarcillin / clavulanic acid) СА бе в границите 90.3 - 96.8%. Независимо от тези приемливи стойности, поради наличието на по един изолат с VMD (т.е. фалшиво чувствителен) при определянето на

чувствителността към colistin и ceftazidime, общото ниво на VME определи изпитването на чувствителността към тези два препарата по дисково-дифузионния метод като недостатъчно акуратно. В пълно съответствие с ISO стандартите бе определянето чрез Е тест на чувствителността към ciprofloxacin и levofloxacin. Подобно на дисково - дифузионния метод, и при Е теста с най-висока честота на дискордантност при съпоставяне с определения за еталон метод, бе определянето на чувствителността към ticarcillin / clavulanic acid и в този случай Е теста също бе определен като недостатъчно точен.

Различните методи за определяне на чувствителността на *S. maltophilia* към антибиотици са обект на няколко проучвания. Nicodemo и колектив сравняват резултатите от изпитването на чувствителността на 70 изолата *S. maltophilia* към седем антибактериални препарата (chloramphenicol, doxycycline, gatifloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ticarcillin / clavulanate, colistin и polymixin B) по три алтернативни метода – дисково - дифузионен, Е тест и метода на разреждане в агар, определен за еталонен. Получените резултати демонстрират отлична корелация между дисково - дифузионния тест и дилуционните тестове при определяне на активността на chloramphenicol, doxycycline, gatifloxacin, trimethoprim / sulfamethoxazole and ticarcillin / clavulanate. Единствено при определяне акуратността на дисково - дифузионния метод по отношение полимиксиновите антибиотици са получени незадоволителни резултати с неприемливо високо ниво на VME. Е тест методът демонстрира добра корелация с определения за референтен метод на серийните разреждания в агар, което авторите приемат за индикация, че той е подходящ и надежден за определяне чувствителността на *S. maltophilia* към тази група антибиотици.

За разлика от тях, при сравнителен анализ на дисково - дифузионния тест, Е тест, автоматизираната система Phoenix и метода на разреждания в агар, използван за референтен метод, Gulmez и колектив са документирали неприемливо висока честота на несъответствия при дисково - дифузионния метод за ciprofloxacin, ticarcillin/clavulanic acid и colistin. Тези резултати напълно съответстват на получените от нас данни, тъй като именно при тези три антибактериални препарата, сме документирали най - висока честота на VME. По отношение на Е теста, авторите отбелязват не-добра корелация с референтния метод за ciprofloxacin и ticarcillin/clavulanic acid.

При автоматизираната система Phoenix авторите установяват и не-добра корелация за бета - лактамните антибиотици - piperacillin/tazobactam и в по- малка степен ceftazidime (ticarcillin/clavulanic acid не е тестван), докато по отношение на останалите, изпитани чрез Phoenix препарати (ciprofloxacin и trimethoprim/sulfamethoxazole), резултатите демонстрират много добро ниво на съответствие.

Много висока честота на VME (съответно 44 и 60%) са документирани от Mesgala и колектив за дисково - дифузионния метод и Е теста при определяне на чувствителността към trimethoprim/sulfamethoxazole при сравнението им с модификация на бульонния метод на серийните разреждания. Същото проучване съобщава и за не-добра корелация на тези два метода при определяне чувствителността към ceftazidime (с VME съответно 28 и 16%) и ciprofloxacin (с VME съответно 32 и 12%). Не-добра корелация на дисково - дифузионния и Е теста с референтния метод на разреждане в агар е документирана от Otkun по отношение чувствителността на *S. maltophilia* към бета-лактами препарати (ceftazidime, cefepime, ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin, piperacillin/tazobactam) и ciprofloxacin. Същото проучване обаче установява практически пълна конкордантност на двата метода с референтния при trimethoprim/sulfamethoxazole.

Макар данните от проучванията, съпоставящи акуратността на различните методи за определяне на чувствителността към антибактериални лекарствени препарати да са разнопосочни в някои детайли, практически всички са документирали по-добрата акуратност на Е теста в сравнение с класическия дисково - дифузионен тест. Анализирайки данните от проведените от нас сравнителни тестове, също установихме значително по - добра корелация на Е - теста с определения за еталонен метод, в сравнение с дисково - дифузионния тест. Поради тази причина при анализа на нивата на резистентност към антимикробни лекарствени препарати на клиничните изолати *S. maltophilia* използвахме данните, получени от изследването чрез Е теста.

Резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole

Препаратът trimethoprim/sulfamethoxazole е традиционно считан за средство на първи избор и е сред най - често препоръчаните за лечение на причинените от *S. maltophilia* заболявания, заради високата му активност спрямо този бактериален вид. Освен при случаите с лабораторно доказана устойчивост към препарата, основна контраиндикация за включването на trimethoprim/sulfamethoxazole в терапевтичната схема са реакциите на непоносимост или свръхчувствителност към препарата. Голямата част от мащабните проучвания, мониториращи резистентността на *S. maltophilia* към антибактериални лекарствени средства съобщават за високи нива на чувствителност към trimethoprim/sulfamethoxazole. Така например, проучването SENTRY върху резистентността на респираторни изолати *S. maltophilia* за периода 1997 – 2011г. докладва за чувствителност към препарата, надвишаваща 90% (в границите 90 - 100%) във всички мониторирани региони. Напълно съхранена чувствителност (100%) към trimethoprim/sulfamethoxazole на всички изолати от бактериите е установена от Livermore в периода 2001 – 2007г. Сравнително високи нива на резистентност са докладвани в определени географски региони и / или при специализирани изследвания на определени групи пациенти, например такива с муковисцидоза.

У нас има богат клиничен опит с употребата на trimethoprim / sulfamethoxazole, включително и при респираторни инфекции, които установихме като най - честите заболявания, причинени от *S. maltophilia*. Отличната бионаличност на препарата след перорално приложение, прави този път на въвеждане предпочитан, основно в амбулаторната практика и много по - рядко в условията на болнично лечение. Не бива да се подценява обаче факта, че при много тежки инфекции и такива при пациенти на апаратна вентилация с VAP, причинени от *S. maltophilia*, пероралното използване е неприложимо. В тези случаи единствено възможно е парентералното приложение на trimethoprim / sulfamethoxazole като интравенозна инфузия във високи дози, достигащи до 120 mg/kg/24 часа, разпределени на четири приема (подобен дозов режим се прилага за лечение на *Pneumocystis jirovecii* – пневмония).

В България все още липсва достатъчно богат клиничен опит с парентералното приложение на trimethoprim / sulfamethoxazole. Съществуват данни, че употребата му във високи дози често отключва реакции на непоносимост, което е допълнителен рисков фактор за пациентите в тежко общо състояние. Според някои автори обаче дори и в тези случаи следва да се пристъпи към десенсибилизация с оглед високата активност спрямо *S. maltophilia*.

Нашите данни също демонстрират почти напълно съхранена чувствителност на тестваните изолати *S. maltophilia* към trimethoprim/sulfamethoxazole (95.84%). Единствените четири изолата, резистентни към препарата са изолирани от трахеални секрети на пациенти, хоспитализирани в интензивни клиники на УМБАЛ "Света Марина" - Варна. Всички те демонстрираха *in vitro* високи стойности на МПК над 32 µg/ml (определена чрез Е тест и автоматизираната система Phoenix) и плътен конфлуентен растеж около диска при използване на дисково - дифузионния метод. В групата на чувствителните към препарата изолати, МПК бяха с много ниски стойности, вариращи в диапазон 0.016 – 2 µg/ml (при гранични стойности за чувствителност ≤ 4 µg/ml по EUCAST). Много ниските МПК на чувствителните изолати са индикация за отличната ефективност на комбинирания препарат.

Резистентността на *S. maltophilia* към trimethoprim/sulfamethoxazole вече е документирана и у нас. Още през 1998г. Събчева съобщава за 93.3% относителен дял на чувствителни към trimethoprim/sulfamethoxazole изолати *S. maltophilia* - нива, почти напълно съизмерими с нашите резултати. В това проучване са анализирани нивата на резистентност на 45 изолата *S. maltophilia* от пациенти с онкологични заболявания, като 43 от тях са били хоспитализирани в интензивни реанимационни звена. В проучване на Михайлова и колектив се съобщава за 15 изолата от периода 1999 – 2007г., устойчиви на trimethoprim/sulfamethoxazole, всички с високи МПК над 32 µg/ml, подобно на установените от нас, определени първоначално чрез VITEC 2 и впоследствие потвърдени чрез Е тест. Авторите съобщават, че доминиращата част от изолатите са от интензивни клиники

Документираните нива на резистентност в съседни държави са значително по-високи. Така например, автори от Турция посочват ниво на резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole средно 28.3%, с изразена тенденция към повишение през петгодишния период на проучването. Проучените от нас резистентни на trimethoprim/sulfamethoxazole изолати *S. maltophilia*, са идентифицирани в периода 2014 - 2015г, т.е. в края на обхванатия от проучването ни времеви интервал и подобна тенденция не може да бъде напълно изключена.

Резистентност към хинолони (ciprofloxacin и levofloxacin)

Флуорохинолоните са добра алтернатива за лечение на асоциираните със *S. maltophilia* заболявания. Активността на различните представители на групата на хинолоновите препарати варира значително. Едни от най-често употребяваните представители на тази група са ciprofloxacin и levofloxacin.

Активността на ciprofloxacin според повечето проучвания не е много висока, като относителния дял на чувствителните към препарата изолати варира в границите 20.9 – 55%. Нашите данни демонстрират сравнително добра активност на препарата с ниво на чувствителност 62.5%, което е значително по-високо от съобщаваното в повечето проучвания. Освен това, немалка част от изолатите демонстрираха интермедиерна чувствителност, т.е. МПК в границите 0.5-1 µg/ml. При такива случаи все пак би могло да се очаква благоприятен терапевтичен ефект, най-вече при прилагането на ciprofloxacin за лечение на комплицирани уроинфекции, заради достигането на високи концентрации на препарата в урината, многократно превишаващи серумните му нива. Уроинфекциите, причинявани от *S. maltophilia* са обаче сравнително редки, за сметка на респираторните, а в белодробния паренхим нивата на ciprofloxacin са значително по-ниски от тези в урината, което би компрометирало изцяло ефекта на препарата при лечение на респираторни инфекции, причинени от изолати с интермедиерна чувствителност към ciprofloxacin.

У нас, Събчева съобщава за по-ниска от установената от нас чувствителност към ciprofloxacin - 51.1%, а според проучването на Михайлова и колектив активността на препарата е много висока и реално не е документирана високостепенна резистентност, а единствено

интермедиерна чувствителност с МПК $\leq 2 \mu\text{g/ml}$. Препаратът levofloxacin демонстрира in vitro значително по - висока активност спрямо *S. maltophilia* в сравнение с ciprofloxacin, като обичайно нивата на чувствителност надвишават 80%. Данните от SENTRY проучването през последните години обаче сочат тенденция към редуциране на чувствителността. Така например, анализът за периода 1997 – 2001г. сочи ниво на резистентност 6%, докато за периода 2009 – 2012г., тя чувствително е нарастнала до 15.3%. Статистически значима тенденция към намаляване на чувствителността към препарата levofloxacin (от 83.7% през 1998г. към 65.6% през 2008г., $p = 0.014$) е отчетена и в проучване от Тайван.

Нашите данни сочат, че чувствителността към levofloxacin е 88.54%, което го подреди на четвърто място по активност сред изпитваните антибактериални препарати, непосредствено след trimethoprim/sulfamethoxazole и тетра - и глицилциклините. Нивата на чувствителност към levofloxacin не са съществено различни от тези, документиращи при други сходни проучвания, но следва да отбележим факта, че при определянето от нас на чувствителността към levofloxacin възприехме граничните стойности, определени от EUCAST - 2016 (МПК $\leq 1 \mu\text{g/ml}$). Тъй като всички други цитирани проучвания използват критериите, определени от CLSI (МПК $\leq 2 \mu\text{g/ml}$) можем да приемем, че сред нашите изолати чувствителността към препарата е отлична.

Levofloxacin принадлежи към групата на т. нар. „респираторни хинолони”. Освен разширения му спектър на активност и спрямо Грам - положителни причинители на респираторни инфекции като *Streptococcus pneumoniae*, друга важна причина за това е в различните (в сравнение с ciprofloxacin) фармакокинетични свойства, които позволяват изключително добра пенетрация в белодробната тъкан и бронхиалните секрети. Тези му характеристики, наред с по - дългия полуживот и съответно възможността за еднократен дневен прием и подобрения профил на безопасност, го правят един от най-предпочитаните за лечение на бронхо - пулмонални инфекции антибактериален агент. Нашите данни категорично демонстрират отчетливите предимства на levofloxacin пред ciprofloxacin за лечение на предизвиканите от *S. maltophilia* инфекции на дихателната система (които са и сред най-честите, причинявани от този бактериален вид), както заради по - добрата чувствителност към препарата, така и заради подобрения му фармакокинетични характеристики. В

допълнение, levofloxacin има способността да разрушава биофилмите, формирани от *S. maltophilia* и значително да ги редуцира, дори и в субинхибиторни концентрации.

Резистентност към ceftazidime

Въпреки че бета - лактамните антибиотици като цяло имат ниска активност спрямо *S. maltophilia*, in vitro чувствителността на *S. maltophilia* към някои от тях е значителна. Един от най - активните представители на тази група е ceftazidime – цефалоспорин от трета генерация. Сред най - важните характеристики на бета - лактамните антибиотици са бързия бактерициден ефект и добрата поносимост. Тези специфики на групата са валидни и за ceftazidime, който е един от често прилаганите антибактериални препарати в болнични условия у нас, заради много добрата му активност спрямо повечето от Грам - отрицателните бактерии, включително и видове с проблемна чувствителност като *P. aeruginosa*. Съгласно въведените от EUCAST експертни правила обаче, *S. maltophilia* следва да бъде считан за първично резистентен към ceftazidime, независимо от факта, че значителна част от щамовете демонстрират добра in vitro чувствителност към препарата.

Над половината от изпитаните от нас изолати (56.25%) демонстрираха резистентност към ceftazidime с високи стойности на МПК >8 µg/ml. Високи нива на резистентност са получени и от Михайлова и колектив, които са установили сред 15 изолата високи МПК в границите от 12 до > 256 µg/ml и съответно са интерпретирали получените резултати като интермедиерност или резистентност съгласно използваните от тях CLSI - базирани гранични стойности. При използване на същите стандарти, Sader и колектив са документирали чувствителност при 52.9% от изпитаните 2076 изолата *S. maltophilia*, като ceftazidime е определен за препарата с най-добра активност сред всички представители на цефалоспориновите антибиотици. Без да определя нивото на чувствителност към препарата, Livermore съобщава за доста ниски МПК на ceftazidime за изолати *S. maltophilia* от бактериемии, като 93% от тестваните изолати демонстрират ниски МПК < 4 µg/ml.

Резистентност към ticarcillin / clavulanic acid

Ticarcillin / clavulanic acid е определян от някои автори като алтернатива на trimethoprim / sulfamethoxazole за лечение на *S. maltophilia* - свързани инфекции при алергични пациенти. Макар у нас да няма богат клиничен опит с прилагането на ticarcillin / clavulanic acid, той се счита за един от малкото бета - лактами с добра активност спрямо *S. maltophilia*. Повечето проучвания обаче документират сравнително високи нива на резистентност към препарата. Така например, у нас според данните на Събчева 68.9% от изпитаните 45 изолата са резистентни към ticarcillin / clavulanic acid (5). Резултатите на Sader и колектив разкриват относителен дял на чувствителните към препарата изолати от 55.7%.

Нашите резултати потвърждават ниската ефективност на ticarcillin / clavulanic acid по отношение на *S. maltophilia*, като едва 38.5% от изпитаните изолати демонстрираха чувствителност с МПК под 16 µg/ml, определени чрез Е тест. Отбелязваме факта, че при сравняване на Е теста с модифицирания метод на серийните разреждания от Phoenix като референтен, установихме недобра корелация между тези два метода, което поставя въпроса дали акуратността на получените чрез Е тест данни е достатъчно приемлива. Сред документираните от нас грешки доминират големите несъответствия (т.е. фалшиво – резистентни по Е тест метода изолати), което вероятно е една от причините за подобни доста ниски нива на in vitro чувствителност към ticarcillin / clavulanic acid в нашето проучване.

Резистентност към полимиксини (colistin, polymyxin B)

Отскоро антибиотиците от тази група отново навлязоха в клинична употреба след години на ограничения заради потенциалните им сериозни странични ефекти. Днес colistin и polymyxin B се прилагат под строг контрол в болничните заведения, основно за лечение на причинени от полирезистентни *P. aeruginosa*, *A. baumannii* или карбапенем - резистентни *Enterobacteriaceae* тежки инфекции. Ефективността им спрямо *S. maltophilia* е варираща, но като цяло тя е по - ниска от демонстрираната спрямо гореспоменатите бактериални видове. Прецизното лабораторно определяне на чувствителността към полимиксини продължава да е проблематично, като доминира схващането, че поради това, че те

са високомолекулни съединения, дифузията им в агаровите среди е затруднена, което би довело до релативно стесняване на инхибиторните зони, т.е. фалшива резистентност (определяна като MD) при съпоставка с референтните дилуционни тестове. В този смисъл, отчетената от нас много висока честота на фалшиво - чувствителни резултати (определени като VMD) по дисково-дифузионния тест представлява парадоксална находка. Подобни наблюдения са документирали Nicodemo и колектив при сравнително изпитване на чувствителността към полимиксини по три алтернативни начина – дисково-дифузионния, E тест и серийни разреждания в агар. Чрез E тест метода определихме, че МПК на colistin при 86.42% от изолатите *S. maltophilia* е под 4 µg/ml, което ги определи като чувствителни към препарата. При използването на същите гранични стойности за polymyxin B се установи чувствителност при 89.5% от изолатите. Подобни на нашите резултати за polymyxin B са установени през 2005г. сред 203 изолати *S. maltophilia* от бактериемия при мащабно проучване, сравняващо активността на tigecycline с тази на други антибактериални препарати. Според Gales и колектив активността на препарата polymyxin B сред 1256 изолати *S. maltophilia* е 72.5%. Чувствителността към colistin според повечето проучвания също е висока. С относителен дял на чувствителните изолати от 91.2%, colistin е определен като най - активния антибактериален агент спрямо *S. maltophilia* според Samonis и колектив.

В публикувано през 2014г. проучване на Rodriguez е установена директна корелация между увеличената консумация на colistin и нарастването на относителния дял на резистентните към препарата изолати *S. maltophilia* от 8 на 45% в периода 1996 - 2013г. Авторите съобщават, че 80% от пациентите с изолирани colistin - резистентни щамове *S. maltophilia*, са преминали курс на терапия с colistin. Сред проучените от нас изолати логично не се наблюдава тенденция за увеличаване на устойчивостта към полимиксини предвид факта, че у нас colistin практически е въведен в употреба в самия край на периода на проучването.

Резистентност към тетрациклини и глицилциклини (doxycycline, tigecycline)

Препаратите от тетрациклиновата група като цяло имат сравнително добра активност срещу *S. maltophilia*. Единствено по-старите представители като tetracycline са с ограничена активност (едва 8.6% чувствителност според данните от SENTRY 1997 - 2003г.), докато активността на doxycycline е значително по-добра. Flamm и колеktiv в публикувано през 2016г. проучване върху активността на minocycline и други антимикробни лекарствени препарати спрямо *S. maltophilia* (включително doxycycline) установяват само 0.2% резистентни на minocycline сред общо тествани 464 изолата. Активността на doxycycline не е категоризирана от авторите заради отсъствието на стандарт за *S. maltophilia* в CLSI и EUCAST, но са документирани ниски нива на МПК (МПК50 и МПК90, със стойности съответно 2 µg/ml и 4 µg/ml), което е под определените за препарата стандарти, определени от CLSI за семейство *Enterobacteriaceae* и би определило тези изолати като чувствителни към препарата. Нашите данни също демонстрират отличната активност на doxycycline с едва 5.21% устойчивост заради високи МПК над 16 µg/ml. Високата чувствителност към doxycycline го определя като третия по активност от всички тествани антибактериални препарати, непосредствено след считания за средство на първи избор trimethoprim/sulfamethoxazole и tigecycline.

Едно от основните показания за употреба на doxycycline са респираторните инфекции, които са сред най-честите клинични презентации на *S. maltophilia*, заради достигането на високи концентрации в белодробния паренхим. Основната употреба на препарата обаче е в извънболнични условия, заради удобния перорален прием и ниската цена. Използването на doxycycline в болнични условия е сведено до минимум поради липсата на парентерална форма у нас (макар такава да е налична по принцип), което е необходимо условие за прецизното дозиране при тежки нозокомиални пневмонии и такива при пациенти на механична вентилация.

Tigecycline е сред най-активните препарати спрямо *S. maltophilia*. Отскоро въведен в клинична употреба, той демонстрира впечатляваща активност по отношение различни проблемни за лечение патогени,

включително и *S. maltophilia*. Почти всички проучвания сочат ниво на чувствителност, надвишаващо 90%. Нашите данни също доказват много добра *in vitro* активност, дори превишаваща тази на trimethoprim/sulfamethoxazole, като резистентност установихме едва в два изолата, съставляващи 2.08% от всички изпитани.

Възможността за парентерално приложение на tigecycline, наред с отличните му фармакокинетични свойства го правят отличен избор, особено при лечение на бронхо-пулмонални или мекотъканни инфекции. За сметка на високата тъканна концентрация обаче, серумните нива на този антибиотик след интравенозно приложение са ниски, което принципно поставя под съмнение ефикасността му при лечение на бактериемии, свързани със *S. maltophilia*. В скорошно проучване, високи дози tigecycline ефективно са прилагани за лечение на *S. maltophilia* асоциирана бактериемия. Други автори обаче докладват за значими странични ефекти при прилагане на високи дози tigecycline. Всички изолати от бактериемии, включени в настоящото проучване демонстрираха напълно съхранена чувствителност към tigecycline с много ниски нива на МПК в границите 0.05 - 0.9 µg/ml. При нито един от пациентите обаче не е прилаган tigecycline и *in vivo* ефективността на препарата в тази категория пациенти не би могла да бъде коректно определена.

Резистентност към chloramphenicol

Chloramphenicol е сред малкото препарати, демонстриращи *in vitro* активност спрямо *S. maltophilia*. Макар да се употребява сравнително рядко, той все пак влиза в съображение при лечение на причиняваните от *S. maltophilia* инфекции, особено в случаите, когато липсват достатъчно алтернативни възможности за специфична терапия поради резистентност към медикаментите на първи избор. Приложението му в момента е силно ограничено поради риска от сериозни странични ефекти, включително необратимо потискане на кръвотворните функции на костния мозък, макар такива да са регистрирани сравнително рядко. Това обаче практически изключва употребата на chloramphenicol сред пациенти с онко - хематологични заболявания (при които често се регистрират асоциирани със *S. maltophilia* заболявания), независимо от иначе добрите му фармакокинетични характеристики.

Активността на chloramphenicol варира в много широко граници. Така

например, при проучване на 206 недублиращи се изолати *S. maltophilia*, изолирани в университетски болници в Корея през 2010г. е установена едва 7% чувствителност към препарата. Значително по - висока чувствителност е демонстрирана при изследвания в Мексико (45.5%) и Тайван (68.7%). Всички тези проучвания използват определените от CLSI критерии, съгласно които като чувствителни са интерпретирани изолати с МПК $\leq 8 \mu\text{g/ml}$. Идентични са и определените от EUCAST breakpoints за чувствителност към препарата. При интерпретирането на резистентността обаче, има съществени различия между двата стандарта. Докато в CLSI има заложена категория интермедиерност и резистентността се дефинира при МПК $\geq 32 \mu\text{g/ml}$, то EUCAST определя като резистентни всички изолати с МПК $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, без да определя интермедиерна категория. Поради тази причина счетохме, че определената от нас чувствителност (44.79%) директно кореспондира с литературните данни и установихме, че доказаните от нас нива са съпоставими с докладваните по-горе. При съпоставка на нивата на резистентност обаче (именно поради различията в стандартите), определените от нас нива (55.21%) са по - високи от установените от другите автори (49%, 8.8%, 20.2%). Ниските нива на чувствителност допълнително ограничават широкото приложение на chloramphenicol за лечение на причиняваните от *S. maltophilia* инфекции. Подобен избор би бил основателен при тежки инфекции, причинени от т. нар. „екстензивно резистентни” изолати *S. maltophilia*, дефинирани от Fagalias и Karageorgopoulos като такива, когато демонстрират резистентност към няколко различни антимикробни препарати. При подобен случай, chloramphenicol успешно е използван за лечение при пациент с миелофиброза.

В заключение, нашите данни сочат, че дисково-дифузионния метод е неподходящ за лабораторното определяне на чувствителността на *S. maltophilia* към антимикробни препарати заради неприемливо високия процент несъответствия със еталонните методи. Базираният на определяне на МПК епсимоетричен тест дава значително по-добри резултати. От десетте изпитвани антимикробни препарати, най-висока активност спрямо *S. maltophilia* in vitro демонстрира tigecycline, следван от trimethopreme/sulfamethoxazole и doxycycline. С най-ниска активност бе препаратът ticarcillin/clavulanic acid.

Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на респираторни изолати *S. maltophilia*.

При 67 клинични изолата от респираторен тракт (25 от храчки, 30 от трахеални секрети, 5 от плеврални пунктати, 5 от носогърлени секрети, 1 от отривка на небни дъги и 1 гръден дрен) чувствителността бе определена чрез ДДМ и Е тест. Седем от изолатите *S. maltophilia* са от храчки на пациенти с муковисцидоза. Обобщените резултати са представени в таблица 6.

Таблица 6. Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на 67 изолата *S. maltophilia* от респираторен тракт, определена чрез Е тест (брой и %).

Антибактериален препарат	Брой изолати и %		
	S	I	R
SXT	63 / 94.03	-	4 / 5.97
CIP	43 / 64.18	7 / 10.45	17 / 25.37
LVX	59 / 88.06	3 / 4.47	5 / 7.46
DOX	62 / 92.54	2 / 2.99	3 / 4.47
TGC	66 / 98.51	0	1 / 1.49
Pol E (Col)	60 / 89.55	-	7 / 10.45
Pol B	62 / 92.54	-	5 / 7.46
CHL	32 / 47.76	-	35 / 52.24
CAZ	27 / 40.30	-	40 / 59.70
TIM	27 / 40.30	-	40 / 59.70

Анализът на данните от чувствителността на респираторните изолати, включени в настоящото проучване не показва съществени различия с обобщените нива на всички изследвани изолати *S. maltophilia*. Като най-активни антибактериални препарати сред тази група изолати бяха определени tigecycline, следван от trimethoprim-sulfamethoxazole и doxycycline (и трите препарати с над 90% чувствителност). С най-ниска активност бяха chloramphenicol (с 47.76% чувствителност) и ceftazidime и ticarcillin/clavulanic acid (40.3% чувствителност). Тъй като респираторните изолати (62 на брой, включително от храчки, носогърлени секрети, бронхоалвеоларни лаважи, трахеални секрети) са преобладаващата част от всички изолати с определена чувствителност спрямо антимикробни препарати (n = 96), липсата на съществени различия в нивата на резистентност е напълно закономерна.

Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на изолати *S. maltophilia* от пациенти с муковисцидоза.

Сравнително определяне на чувствителността към антибактериални средства на общия брой изолати *S. maltophilia* от респираторен тракт и тези, изолирани от храчки на пациенти с муковисцидоза е представено на таблица 7.

Таблица 7. Относителен дял на чувствителните към антимикробни лекарствени средства изолати *S. maltophilia* от респираторен тракт и от пациенти с муковисцидоза, определени чрез E тест (в брой и %).

Антибактериален препарат	Общ брой респираторни изолати (n=67)	Общ брой изолати от пациенти с муковисцидоза (n=7)	p
SXT	63 / 94.03	7 / 100	n.s
CIP	43 / 64.18	2 / 28.6	p<0.05
LVX	59 / 88.06	5 / 71.4	n.s
DOX	62 / 92.54	7 / 100	n.s
TGC	66 / 98.51	7 / 100	n.s
Col	60 / 89.55	7 / 100	n.s
Pol B	62 / 92.54	7 / 100	n.s
CHL	32 / 47.76	5 / 71.4	n.s
CAZ	27 / 40.30	3 / 42.9	n.s
TIM	27 / 40.30	2 / 28.6	n.s

Означения: n.s.- non significant

При съпоставянето на нивата на чувствителност на всички респираторни изолати с тези от храчки на пациенти с муковисцидоза (представени на таблица 7), се установиха някои съществени разлики. Нивата на чувствителност към хинолоновите препарати ciprofloxacin и levofloxacin сред изолатите от пациенти с муковисцидоза бе значително по-ниско от установеното сред всички респираторни изолати. Докато за levofloxacin степента на различие, макар и надхвърляща 15% (71.4% срещу 88.06% чувствителност) не бе определена като статистически значима ($p>0.05$), то при ciprofloxacin (28.6% срещу 64.18%) различията бяха доказани като статистически значими ($p<0.05$). Хинолоните са сред най-активните препарати спрямо *S. maltophilia*. Същите са и сред най-широко прилаганите медикаменти сред пациенти с муковисцидоза, основно

заради активността им срещу един от най-важните патогени, асоцииран с инфекциозни усложнения при тази група пациенти, а именно *P. aeruginosa*. Възможността за перорален и интравенозен прием ги превръщат в удобно средство за лечение на инфекциозните тласъци на заболяването в и извън болничните заведения. Макар, че като цяло ciprofloxacin рядко влиза в съображение като средство за лечение на бронхопулмонални инфекции в ранната детската възраст, сред пациентите с муковисцидоза той е сред най-често употребяваните в клиничната практика. Възрастовият диапазон на колонизирани със *S. maltophilia* пациенти с муковисцидоза, обхванати от нашето проучване е 8 - 24г. (средно 13г.) и макар сред документираните от нас данни да липсват такива за предшестващата антибиотична терапия, допускаме, че употребата на ciprofloxacin сред тях е много вероятна. Това прави възможна хипотезата за селекция на резистентни изолати *S. maltophilia* сред тази група пациенти и съответно може да обясни сигнификантно по-ниските нива на чувствителност към препарата. Независимо, че при levofloxacin разликите в чувствителността на изолатите от пациенти с муковисцидоза на този етап не бяха установени като статистически значими, все пак подобни различия будят опасения от значимо повишаване нивата на резистентност в бъдеще. Тъй като предстои въвеждането в клинична употреба и на аерозолна форма на препарата levofloxacin, понижението на чувствителността сред клиничните изолати *S. maltophilia* от пациенти с муковисцидоза е тревожен сигнал.

В литературата съществуват данни за високи нива на резистентност към хинолони сред изолати *S. maltophilia*, колонизиращи пациенти с муковисцидоза. При анализ на етиологичния спектър и чувствителността към антимикробни препарати на най-честите патогени от пациенти с муковисцидоза в Испания са установени тревожно високи нива на нечувствителност към ciprofloxacin – 80%. Същото проучване документира нечувствителност към levofloxacin в 54% от изолираните *S. maltophilia*, което е значително по-висока стойност от съобщаваните нива от повечето автори.

Чувствителност към антимикробни лекарствени препарати на изолатите *S. maltophilia* от интензивни и не-интензивни клиники.

Сравнително, резултатите от изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени препарати на изолатите от интензивни и не-интензивни клиники са представени на таблица 8.

Таблица 8. Чувствителност на изолатите *S. maltophilia* към антимикробни лекарствени средства от интензивни и не-интензивни клиники определени чрез E тест. (в брой и %).

Антибактериален препарат	Общ брой изолати от интензивни клиники n=41	Общ брой изолати от не-интензивни клиники n=55	p
SXT	38 / 92.6%	5 / 9.1%	n.s.
CIP	22 / 53.7%	38 / 69.1%	n.s.
LVX	36 / 87.8%	49 / 89.1%	n.s.
DOX	37 / 90.2%	52 / 94.5%	n.s.
TGC	40 / 97.6%	54 / 98.1%	n.s.
Col	37 / 90.2%	45 / 81.8%	n.s.
Pol B	37 / 90.2%	49 / 89.1%	n.s.
CHL	18 / 43.9%	25 / 45.5%	n.s.
CAZ	19 / 46.3%	23 / 41.8%	n.s.
TIM	19 / 46.3%	18 / 32.7%	n.s.

При съпоставяне на нивата на чувствителност на изолатите *S. maltophilia* от интензивни и неинтензивни клиники не се доказаха статистически значими различия при нито един от десетте изпитвани антимикробни препарати. Обичайно установяваният значителен превес на MDR патогени (основно *A. baumannii*, *P. aeruginosa*) от групата на Грам отрицателните неферментативни бактерии в интензивните клиники в сравнение с не-интензивните най-често е в резултат от клонално разпространение на щамове, селектирани от употребата на широкоспектърни антибактериални препарати в интензивните болнични структури. Сред най-вероятните причини за отсъствието на такъв феномен при изолатите *S. maltophilia* е документираната и потвърдена от данните от епидемиологичното типизиране липса на разпространение в тези болнични структури на определен полирезистентен вътреболничен клон.

Чувствителност към антимикробни лекарствени препарати на изолатите *S. maltophilia*, устойчиви към trimethoprimе/sulfamethoxazole.

При четирите клинични изолата *S. maltophilia*, определени като устойчиви към trimethoprimе/sulfamethoxazole, определихме чрез Е тест чувствителността към останалите девет антибактериални препарата. Резултатите са представени на таблица 9.

Таблица 9. Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на изолатите *S. maltophilia*, резистентни към trimethoprimе/sulfamethoxazole (в брой и %)

SXT резистентни изолати (брой)	CIP	LVX	DOX	TGC	Pol E	Pol B	CHL	CAZ	TIM
n=4	1 25%	1 25%	2 50%	3 75%	1 25%	1 25%	1 25%	1 25%	0 0%

В групата на изолатите, резистентни на trimethoprimе/sulfamethoxazole (n=4) установихме значително по-високи нива на резистентност към всички изпитвани антибактериални агенти в сравнение с общото ниво на резистентност сред trimethoprimе/sulfamethoxazole – чувствителните изолати. Всички резистентни на trimethoprimе/sulfamethoxazole изолати бяха определени като резистентни и на ticarcillin/clavulanic acid, а чувствителност към хинолони, полимиксини, ceftazidime и chloramphenicol се установи само при един изолат (25% от всички). С най-добра активност сред trimethoprimе/sulfamethoxazole резистентните *S. maltophilia* бе tigecycline, като три от общо четирите изпитани изолата бяха чувствителни към препарата, и само при един се установи резистентност.

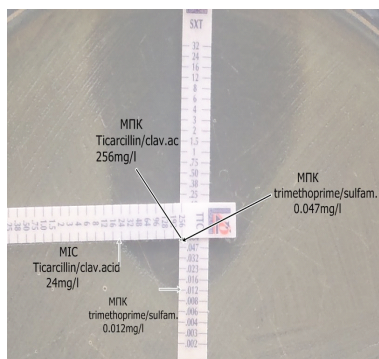
Съгласно стандартизираната терминология, въведена наскоро съвместно от Европейския център за превенция и контрол на заболяванията (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC) и Центъра за контрол и превенция на заболяванията (Center for Disease Control and Prevention - CDC), нечувствителността към поне един антибактериален агент от най-малко три различни антибиотични класа се дефинира като множествена резистентност (MDR), а екстензивната резистентност (XDR) се определя като нечувствителност към поне един антимикробен

агент във всички антибиотични класове с едно или две изключения (т.е. като XDR се определят бактериални изолати с чувствителност само към един или два класа антимикробни препарати). Анализът на профилите на резистентност на четирите trimethoprine/sulfamethoxazole - резистентни изолата *S. maltophilia* показва, че при три от тях се касае за множествена резистентност, а един изolat е с характеристиките на екстензивно-резистентен. В проучване на Liaw и колектив от 2010г. са съпоставени характеристиките на MDR и не-MDR изолати *S. maltophilia*. Авторите съобщават за отчетлива асоциация на MDR изолатите *S. maltophilia* с наличието на клас 1 интегрони. Освен това сред тях е значително по-честа хиперекспресията на ефлуксните помпи SmeABC и SmeDEF, както и високо нивото на експресия на фосфоглюкомутаза (SpgM), която има отношение към синтеза на клетъчната стена при *S. maltophilia*. Комплексното въздействие на подобни механизми вероятно определят резистентността и сред MDR изолатите от настоящото проучване.

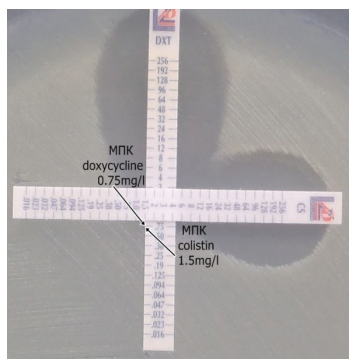
Определяне на ефекта от комбинираното въздействие на антибактериални препарати върху клинични изолати *S. maltophilia* чрез E тест.

При изпитването на комбинираното въздействие на антибактериалните препарати върху 27-те клинични изолата *S. maltophilia* се установи, че при две от изпитаните общо пет антибиотични комбинации се установява значим (в над 50%) синергистичен ефект (trimethoprine/sulfamethoxazole + ticarcillin/clavulanic acid и levofloxacin + ceftazidime).

При останалите три двойки препарати доминираше ефекта на индиферентност. При четири изолата бе отчетен антагонизъм: в два изолата - за комбинацията doxycycline + colistin и по един – за комбинациите trimethoprine/sulfamethoxazole + ticarcillin/clavulanic acid и levofloxacin + ceftazidime. In vitro феномените, демонстриращи синергизъм и индиферентност са представени на фигура 3. Подробните данни за ефекта от антибиотичните комбинации при всички 27 изолата са представени на таблица 10.



А. МПК на ticarcillin/clavulanic acid и trimethoprim/sulfametoxazole при самостоятелно приложение: 256 и 0.047 $\mu\text{g/ml}$. МПК на ticarcillin/clavulanic acid и trimethoprim/sulfametoxazole при комбинирано приложение: 24 и 0.012 $\mu\text{g/ml}$ - синергизъм, FICI 0.35.



Б. МПК на colistin и doxycycline при самостоятелно приложение: 1.5 и 0.75 $\mu\text{g/ml}$. Липсва промяна на МПК на colistin и doxycycline при комбинирано приложение - индиферентност, FICI = 2.

Фигура 3. *In vitro* определяне на взаимодействието на антибактериалните препарати чрез Е тест.

Таблица 10. Ефект (синергизъм, антагонизъм, адитивност, индиферентност) на антибиотичните комбинации върху 27 клинични изолата *S. maltophilia* (в % и брой).

Антибиотична комбинация	Syn %, (n)	Ad %, (n)	Ind %, (n)	Ant % (n)
SXT + TTC	55.6% (15)	14.8% (4)	25.9% (7)	3.7% (1)
CIP + TGC	7.4% (2)	3.7% (1)	88.9% (24)	- (0)
LVX + CAZ	66.7% (18)	14.8% (4)	14.8% (4)	3.7% (1)
DOX + COL	7.4% (2)	3.7% (1)	81.5% (22)	7.4% (2)
CHL + Pol B	3.7% (1)	18.5% (5)	74.1 (20)	3.7 (1)

Syn, синергизъм; Ad, адитивност; Ind, индиферентност; Ant, антагонизъм

Комбинираната употреба на антимикробни лекарствени средства е честа практика, особено в терапията на тежки инфекции, причинени от полирезистентни бактерии. Предпочитанията за комбиниран антибиотичен режим при лечението на асоциираните със *S. maltophilia* заболявания се основават на безспорните ползи, като например избягване развитието на резистентност, снижаване на нивото на очакваните странични/токсични ефекти, повлияването едновременно на повече от един бактериален вид в условията на смесена инфекция и др.

Нашите резултати сочат, че две от общо петте изпитани антибиотични комбинации (levofloxacin + ceftazidime и ticarcillin/clavulanic acid + trimethoprim/sulfamethoxazole) демонстрират в над 50% ефект на синергизъм (фиг. 3А). При останалите три антибиотични комбинации (ciprofloxacin + tigecycline, doxycycline + colistin и chloramphenicol + polymyxin B) доминираше ефекта на индиферентност (74.1 – 88.9%) (фиг. 3Б). Само при единични изолати *S. maltophilia* бе отчетен антагонистичен ефект. Най-често такъв бе документиран при комбиниране на doxycycline с colistin - 7.4%.

С най - висок относителен дял на синергизъм (66.7%) in vitro бе комбинацията между levofloxacin и ceftazidime. И двата препарата са утвърдени в лечебната практика и са чест избор при лечение на асоциираните със *S. maltophilia* заболявания. Препарата levofloxacin е с подобрени фармако - кинетични свойства в сравнение с по - старите препарати като ciprofloxacin и според някои проучвания е с най-висока активност спрямо този бактериален вид при самостоятелно приложение. Резултатите от самостоятелното изпитване на чувствителността към levofloxacin на 27-те тествани изолата потвърждават високата активност на този антибиотик, като 81.5% от тях демонстрираха чувствителност. За разлика от levofloxacin, спрямо ceftazidime бяха установени високи нива на резистентност при самостоятелното му изпитване (63%). Независимо от този факт обаче, предвид високия относителен дял на изолатите, при които тази комбинация има синергистичен ефект, прилагането на ceftazidime в комбинация с levofloxacin е оправдана от клинична гледна точка. Проучването на Vissali върху 20 клинични изолата *S. maltophilia*, също доказва синергизъм на комбинацията levofloxacin и ceftazidime при над 50% от тестваните изолати чрез методите „checkerboard“ и „time kill“.

Макар и в по-малка степен, превес на синергистичен антибиотичен

ефект (55.6%) бе отчетен и по отношение на комбинацията trimethoprimе/sulfamethoxazole и ticarcillin/clavulanic acid. Самостоятелното изпитване на активността на trimethoprimе/sulfamethoxazole показва високата му активност с относителен дял на чувствителните изолати 85.1% с много ниски МПК в границите 0.016 - 0.5µg/ml. Ticarcillin/clavulanic acid е сред малкото бета-лактамни препарати с добра активност спрямо *S. maltophilia*, но нашите данни сочат, че активността му е ниска при самостоятелното му приложение, тъй като едва 25.9% от 27-те тествани клинични изолата бяха чувствителни. В комбинация с trimethoprimе/sulfamethoxazole обаче установихме синергистичен ефект, като общият дял на изолатите, демонстрирали синергизъм и адитивност надхвърля 70%. Това дава основание комбинацията от двата препарата да бъде препоръчана при лечението на свързаните със *S. maltophilia* заболявания. В проучването на Chung и колектив от 2013г. на ефекта на антибиотични комбинации върху 206 клинични изолата *S. maltophilia* чрез checkerboard метода, комбинацията на trimethoprimе/sulfamethoxazole и ticarcillin/clavulanic acid е установена като най-синергистичната с относителен дял на демонстриралите синергизъм изолати 66%.

Отбелязваме факта, че с най - висок относителен дял на синергизъм бяха двете комбинации, в които бяха включени бета-лактамни препарати. Значителното понижаване на нивата на МПК на ceftazidime и ticarcillin/clavulanic acid при комбинирането им с други антимикробни препарати (в случая trimethoprimе/sulfamethoxazole и levofloxacin) интерпретирахме като индикация, че те могат да бъдат ефективни при правилното им прилагане в условията на комбиниран антибиотичен режим. Тази находка ни дава основание да препоръчаме употребата на бета-лактамни препарати (с много ниска активност при самостоятелно приложение) като част от комплексното лечение на проблемни пациенти с комплицирани инфекции, причинени от *S. maltophilia*.

Единствените четири изолата, определени като резистентни към trimethoprimе/sulfamethoxazole (МПК \geq 32 µg/ml), бяха устойчиви и към ticarcillin/clavulanic acid (МПК = 64 – 256 µg/ml). Комбинираното приложение на trimethoprimе/sulfamethoxazole и ticarcillin/clavulanic acid при тези 4 изолата се демонстрира с индиферентност. Това налага извода, че при високо ниво на устойчивост и към двата препарата не следва да се очаква синергизъм и респективно терапевтичен ефект, а да се търсят

други алтернативни схеми за лечение. За разлика от нас, други автори чрез използването на „time kill“ и „checkerboard“ – методите установяват синергизъм при тази комбинация в случаи с trimethoprim/sulfamethoxazole - резистентни щамове *S. maltophilia*.

От данните за антибиотичната чувствителност на изолатите установихме, че най - активният препарат е tigecycline, като само при един от 27-те изолата *S. maltophilia* бе отчетена резистентност (МПК 4µg/ml), а във всички останали случаи отчетохме напълно съхранена активност на препарата (МПК 0.09 - 2µg/ml). При комбинирано тестване на tigecycline с ciprofloxacin, само при два изолата се доказва in vitro синергизъм, а при един - адитивност. Във всички останали случаи при взаимодействието на препаратите се демонстрира индиферентност. Предимно индиферентен ефект при комбинирането на tigecycline и хинолоновия препарат levofloxacin е документиран и в проучването на Church върху инвазивни изолати *S. maltophilia*, базирано на използваната от нас Е тест методика. Този резултат не дава основание комбинирането на tigecycline с хинолонови препарати да бъде препоръчано в клиничната практика за лечение на инфекции, причинени от *S. maltophilia*. Поради отсъствието на данни за антагонистично взаимодействие, остават съображенията за комбиниране на двата препарата при лечение на ко-инфекции с други полирезистентни бактериални видове като *P. aeruginosa*, спрямо които tigecycline е недостатъчно ефективен при самостоятелно приложение.

В последните години, употребата на полимиксини (polymyxin В и colistin) нараства все повече, като основна причина е нарастването на относителния дял на инфекциите, причинени от полирезистентни Грам отрицателни бактерии като *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и др. Активността на препаратите от тази група спрямо *S. maltophilia* при самостоятелно приложение е вариабилна, но като цяло е по-ниска от тази, демонстрирана спрямо гореспоменатите Грам отрицателни видове. Синергистичен in vitro ефект е документиран при комбинираното приложение на полимиксини с различни антибактериални препарати като rifampin, ceftazidime, meropenem и trimethoprim/sulfamethoxazole. Нашите данни показват, че комбинирането на полимиксиновите антибиотици с doxycycline и chloramphenicol се асоциира предимно с индиферентен ефект (74.1% - 81.5%), което прави тези комбинации неудачни за клинично приложение.

Единични са изолатите *S. maltophilia*, които демонстрират ефект на синергизъм, както и такива, демонстриращи ефект на антагонизъм.

Комбинирането на антибиотични препарати често се използва в лечението на инфекции, причинени от полирезистентни бактерии, както е *S. maltophilia*. Настоящото проучване установява в значителен процент от изолатите *in vitro* синергистичен ефект при комбинирането на trimethoprim/sulfamethoxazole и levofloxacin с бета - лактамни препарати като ticarcillin/clavulanic acid и ceftazidime. Това дава основание подобни комбинации да бъдат препоръчвани за клинична употреба. Получените данни дават насока за адекватен подбор на подходяща комбинирана антибиотична терапия при пациенти със *S. maltophilia* асоциирани инфекции.

Детекция на широкоспектърни бета лактамази чрез фенотипни методи: двойно – дисков тест за синергизъм.

При 148 клинични изолата се приложи двойно - дисковия тест за синергизъм (DDST) по метода на Jarlier с цел скрининг. Тестваните изолати се подбраха на случаен принцип и включваха такива от различни клиники и с различен профил на резистентност (включително и към бета-лактамни препарати). След тестването на всички изолати, при 64 (41.8%) от тях бе отчетен позитивен резултат. При тях допълнително се проведе IEF и Bioassay, както и PCR за детекция на бета-лактамази от групите CTX-M, SHV и TEM.

DDST по метода на Jarlier е един от най-често използваните фенотипни методи за детекция на широкоспектърни бета-лактамази сред семейството на чревните бактерии. Той често се използва в клиничната бактериология с цел скрининг за ESBL продукция в тази група бактерии. При *S. maltophilia* тестът често е позитивен заради вродената бета - лактамна активност. При проучване на Hejnal и колектив на позитивността на DDST сред 58 изолата *S. maltophilia* са установени 55 различни профила на резистентност към бета-лактамни препарати и логично е документирано, че с най-висока честота (81%) *in vitro* синергизъм се установява между aztreonam и клавуланова киселина. Авторите дори предлагат DDST като възможен метод за типизиране на *S. maltophilia*.

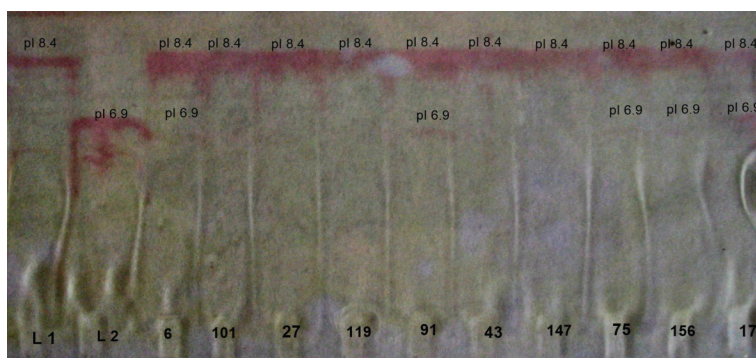
DDST по Jarlier е използван и като скрининг през 2006 г. от Naiemi и колектив при откриването на два ензима в клиничен изолат *S. maltophilia* -

CTX - М - 1 и SHV. Позитивността на теста е документирана от авторите, а впоследствие присъствието на CTX - М - 1 и SHV е потвърдено чрез групово специфична PCR.

Изоелектрично фокусиране (IEF) и биологичен тест за бета - лактамазна хидролитична активност (Bioassay).

IEF и Bioassay доказаха продукцията на една (във всички изолати) или две (в 25 изолата) бета - лактамази с точка на изоелектрично фокусиране pI 8.4 и 6.9, респективно.

На фигура 4 е представен резултата от IEF на 10 изолата *S. maltophilia*.



Фигура 4. Изоелектрично фокусиране на 10 изолата *S. maltophilia*, експресиращи бета-лактамази с pI 8.4 и 6.9.

Една от най-типичните видови особености на *S. maltophilia* е наличието на два хромозомно кодирани ензими с бета-лактамазна активност с точки на изоелектрично фокусиране pI 6.9 и pI 8.4 за L1 и L2 респективно. Днес е известно, че L1 бета-лактамазата принадлежи към групата на метало бета-лактамазите, и като всички тях не се инхибира от клавуланова киселина, а от EDTA и дипиколонова киселина. В субстратния ѝ профил са цефалоспорините от трета генерация и imipenem, но не и aztreonam. За разлика от L1, L2 ензимът принадлежи към клас А бета - лактамазите, инхибира се от клавуланова киселина, а спектърът ѝ обхваща цефалоспорините от трета генерация, aztreonam, но не imipenem – т. нар хромозомна ESBL. Индуцибелният характер и различното ниво на

експресия на двата ензима са сред основните причини за разнообразието на профилите на резистентност към бета-лактамни антибиотици в рамките на вида.

При първата детекция на бета - лактамазата TEM - 2. в клиничен изолат *S. maltophilia*, IEF е използван като скринингов метод, като чрез него фенотипно е доказван ензим с бета - лактамазна активност с различна точка на изоелектрично фокусиране от тези на вродените L1 и L2 – pI 5.6. Впоследствие проведената PCR потвърждава наличието на TEM - 2.

При всички 64 изпитани от нас изолата се доказва бета - лактамаза с pI 8.4, отговаряща на L2. Тази находка добре кореспондира с позитивността на DDST при изпитаните чрез изоелектрично фокусиране изолати, тъй като ензима L2 има всички характеристики на ESBL от група A и демонстрира същите *in vitro* феномени както останалите ѝ представители. Бета - лактамаза с pI 6.9, отговаряща на L1 ензима, установихме при по-малка част от изпитаните изолати, което е очаквана находка предвид различните нива на експресия на този ензим. При нито един от изпитаните изолати не се установи бета - лактамаза с различна pI от тази на хромозомно кодираните L1 и L2.

Детекция на гени, кодиращи резистентност към β – лактами: полимеразо - верижна реакция (PCR) за детекция на гени, кодиращи ESBLs – CTX - M, SHV и TEM тип.

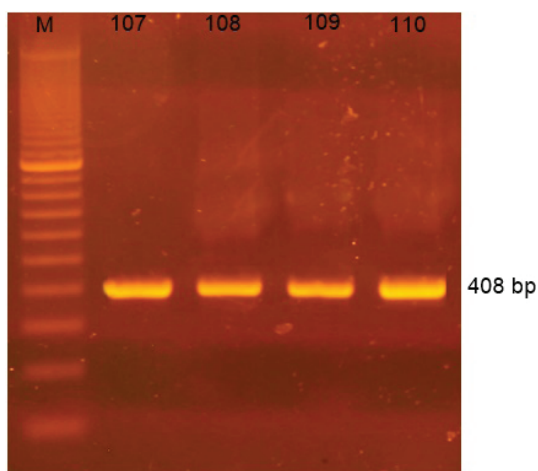
PCR експериментите за детекция на гени, кодиращи ESBL – CTX-M, SHV и TEM бяха негативни при всички 64 изолата.

Основните изводи от тези експерименти са, че позитивността на DDST при *S. maltophilia* не кореспондира с наличието на ESBLs, различни от видово специфичните L1 и L2 и интерпретацията на теста е силно затруднена при представителите на този бактериален вид. Данните от изоелектричното фокусиране демонстрират различното ниво на експресия на двата хромозомно локализирани гена, кодиращи бета-лактамазите L1 и L2, но не потвърждават присъствието на бета - лактамази с различни от техните характеристики. Независимо от резултатите на други автори за разпространение на гени, кодиращи бета-лактамази от групите TEM, SHV и CTX-M сред клинични изолати *S. maltophilia*, при нито един от проведените от нас PCR експерименти не се доказаха такива гени. Това

ни дава основание да считаме, че разпространението им в рамките на вида далеч не е повсеместно и до момента няма основание *S. maltophilia* да бъде считан за резервоар на такива гени, феномен, който вече е документиран при други бактериални видове от групата на Грам отрицателните неферментативни бактерии като *P. aeruginosa* например.

Детекция на гени, кодиращи резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole : полимеразо - верижна реакция (PCR) за детекция на *sul* гени

При четири изолата *S. maltophilia*, резистентни на trimethoprim/sulfamethoxazole се доказва *sul* 1 ген. На фигура 5 е представен резултатът от PCR теста за детекция на *sul* 1 ген при четирите изпитани изолата.



Фигура 5. Позитивен резултат от PCR за детекция на *sul* 1 гени при 4 изолата *S. maltophilia*.

Trimethoprim/sulfamethoxazole е средство на избор при лечение на инфекциите, причинени от *S. maltophilia* и устойчивостта към него има важно клинично значение. Резистентността към препарата най - често се дължи на *sul* гени (основно *sul* 1 и в по-малка степен *sul* 2), кодиращи форми на дехидроптеорат синтетаза, нечувствителни към действието на препарата. При проучване на механизмите на резистентност към

trimethoprim/sulfamethoxazole, Toleman и колектив установяват *sul 1* гени, локализирани на клас 1 интегрон в 17 от общо 25-те резистентни към препарата изолати, а всички чувствителни към препарата изолати са доказани като негативни за *sul 1*. *Sul 1* положителните изолати *S. maltophilia* произхождат от различни географски райони (Северна и Южна Америка, Испания, Турция, Италия и Германия) и всички те са били свързани с клас 1 интегрони. Документирано е първостепенното значение на този ген за развитие на устойчивост към препарата, като за сравнение броят на *sul 2* позитивните, резистентни на trimethoprim/sulfamethoxazole изолати е едва 9, т.е. почти двукратно по-нисък в сравнение със *sul 1* положителните. Подобни данни са документирани от Song при анализ на механизмите за резистентност сред 120 клинични изолати *S. maltophilia*. Установена е статистически достоверна зависимост между резистентността към trimethoprim/sulfamethoxazole и наличието на *sul 1* ген и клас 1 интегрони. Този механизъм е посочен от авторите като водещ за детерминирането на резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole. В генни касети, включени в състава на клас 1 интегроните са доказани множество кодиращи резистентност гени като *aacA4*, *aadA1*, *aac6'-II*, които се асоциират с множествената резистентност сред trimethoprim/sulfamethoxazole – резистентните *S. maltophilia*. Подобни са и данните на Chang, които установява, че в 81% от изолатите, демонстриращи устойчивост към trimethoprim/sulfamethoxazole се доказват *sul 1* ген и клас 1 интегрони. При проучване на антибиотичната чувствителност на 64 изолата *S. maltophilia* в Малайзия през 2012г. е установена отличната ефективност на препарата с едва един високостепенно устойчив изолат (МПК >32 µg/ml), който впоследствие е доказан като *sul 1* – положителен.

Макар и по-рядко резистентността към trimethoprim/sulfamethoxazole се асоциира с генни касети *dfrA*, които са локализирани на клас 1 интегрони и кодират ензима дехидрофолатредуктаза. През последните години се доказва и ролята на свръхекспресията на някои от ефлуксните помпи (типични за този бактериален вид) за развитието на резистентност към комбинирания препарат.

С оглед на честата асоциация на *sul 1* гена с резистентността към trimethoprim/sulfamethoxazole при *S. maltophilia*, при всички установени от нас устойчиви към препарата изолати (с МПК>32 µg/ml) проведохме PCR за детекция на този ген. Позитивният резултат при всички изпитани

изолати потвърждава водещото значение на този механизъм за развитието на *in vitro* резистентност сред клиничните изолати. Поради асоциацията на *sul* 1 с интегрони от клас 1, възможността за хоризонтален трансфер на този ген и респективно, сигнификантно нарастване на нивата на резистентност към сочения за най-ефективен препарат trimethoprim/sulfamethoxazole е напълно реална. Четирите *sul* 1 позитивни изолата са от трахеални секрети на пациенти, хоспитализирани в интензивни клиники на УМБАЛ „Света Марина” Варна в края на обхванатия от проучването ни период (2014-2015г). Фактът, че са изолирани в три различни болнични интензивни звена (КАИЛ, Интензивно Респираторно Отделение и Клиника по Кардиохирургия) и в сравнително дълъг времеви интервал не показва директна връзка между изолатите. Тъй като тези изолати не са сред типизираните чрез RAPD PCR, не бихме могли категорично да потвърдим или отхвърлим хипотезата за клоналното им разпространение в интензивните болнични структури. Множествена резистентност е доказана при всички *sul* 1 позитивни изолати, което би могло да бъде обяснено с локализиране на *sul* 1 гена в състава на генни касети, съдържащи допълнителни гени, кодиращи резистентност към множество неродствени антибактериални препарати и/или свръхекспресия на някои от ефлуксните помпи, типични за вида.

Наличието на *sul* 1 ген при всички резистентни на trimethoprim/sulfamethoxazole изолати *S. maltophilia* е ясна индикация за водещата им роля за развитието на клинично значима, високостепенна резистентност. Мобилността на тези гени заради честото им асоцииране с клас 1 интегрони прави възможно разпространението им в рамките на вида и увеличаване на резистентността към trimethoprim/sulfamethoxazole. Предвид високата ефективност на препарата, това би имало сериозни, неблагоприятни последствия за лечението на причиняваните от този бактериален вид заболявания.

Епидемиологичното типирание чрез случайно амплифициране на полиморфна ДНК – RAPD PCR (Random amplified polymorphic DNA).

Всички изследвани 148 изолата генерираха разпознаваеми RAPD – профили, съставени от 5 - 19 бенда, с размери в границите 160 – 2800 bp. В 70.9% (n=103) от всички типизирани изолати *S. maltophilia* бяха доказани уникални RAPD профили. Сред останалите 45 изолата бяха идентифицирани 16 малки клъстерни групи (А - Q), представени от 2 до 5 изолата всяка. Щамовете във всяка от тези групи бяха охарактеризирани като напълно идентични или такива с висока степен на сходство (над 0.8), което ги определи като клонално свързани.

Епидемиологично типирание на изолатите *S. maltophilia* от УМБАЛ „Света Марина”, СБАГАЛ „Проф. Д-р Д. Стаматов” и МБАЛ „Света Анна” - Варна.

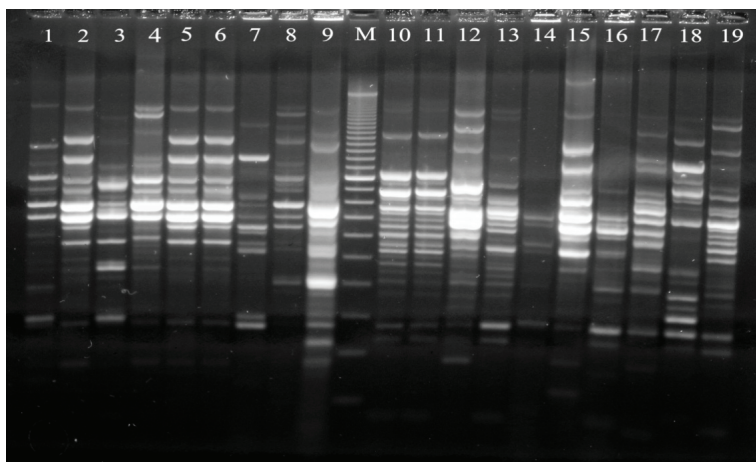
Сред типизираните изолати от УМБАЛ „Света Марина” (n=106), осемдесет и един (76.5%) демонстрираха уникални RAPD профили, включително и седемте изолата от пациенти с муковисцидоза. За изолата от болнична среда, както и този от ръцете на болничен персонал също бяха установени уникални RAPD профили. Двадесет и пет изолата от цялата проучена група (23.5%) бяха включени в 10 малки клъстери, всеки състоящ се от 2 - 3 изолата. Те бяха установени в Клиниката по анестезиология и интензивно лечение (КАИЛ), Интензивно Детско Отделение (ИДО), Гръдна хирургия (ГХ), Кардиохирургия (КХК), I Вътрешно отделение (I BO), I Пулмологично отделение и Хепато - гастроентерология (ХГЕ) (таблица 11; фигури 9 и 10).

Данните за клонално свързаните изолати от УМБАЛ „Света Марина” Варна, отнасящи се до дата на изолиране, вид на клиничния материал, RAPD профил, пол и възраст на пациентите са представени на таблица 11.

Таблица 11. Характеристики на клонално свързаните изолати от УМБАЛ "Света Марина" – Варна.

№	Дата на изолиране	Възраст	Пол	Клиничен материал	Отделение	RAPD
27*	27.10.2007	63	ж	трахеален секрет	КАИЛ	G
29*	21.11.2007	63	ж	трахеален секрет	КАИЛ	
8	30.11.2010	88	ж	трахеален секрет	КАИЛ	
22	12.06.2008	67 г.	ж	плеврален пунктат	I BO	H
23	12.06.2008	54 г.	ж	храчка	I BO	
44	30.08.2011	3 г.	м	урина	ИДО	I
95	30.09.2012	1 мес.	м	гърлен секрет	ИДО	
47	29.10.2011	85 г.	м	плеврален пунктат	ГХ	J
48	1.11.2011	65 г.	м	плеврален пунктат	ГХ	
100	2.11.2012	60 г.	м	рана	ГХ	
97	10.10.2012	69 г.	ж	трахеален секрет	ККХ	K
102	12.12.2012	72 г.	ж	трахеален секрет	ККХ	
20	22.03.2011	63 г.	м	асцитна течност	ХГЕ	L
21	22.03.2011	60 г.	ж	асцитна течност	ХГЕ	
73	1.06.2012	56 г.	м	асцитна течност	ХГЕ	
24	27.12.2007	62 г.	м	храчка	I пулмология	M
25	18.06.2009	57 г.	м	храчка	I пулмология	
67	13.05.2012	5 г.	м	храчка	ИДО	N
70*	10.05.2012	1.5 г.	м	трахеален секрет	ИДО	
72*	21.05.2012	1.5 г.	м	трахеален секрет	ИДО	
90	10.09.2012	72 г.	м	храчка	I пулмология	O
91	13.09.2012	75 г.	м	храчка	I пулмология	
51	29.12.2011	56 г.	м	асцитна течност	ХГЕ	P
81	15.06.2012	67 г.	м	асцитна течност	ХГЕ	
87	23.08.2012	54 г.	м	асцитна течност	ХГЕ	

*изолати № 27 и 29, респективно № 70 и 72 са изолирани от един пациент и са с идентични RAPD – профили.

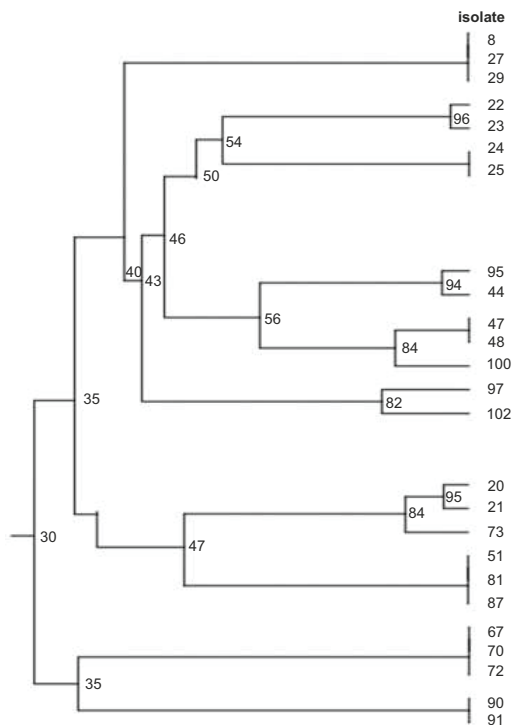


Фигура 6. RAPD профили на 19 клинични изолата *S. maltophilia*, изолирани от различни клиники на УМБАЛ „Света Марина” - Варна. М стандартен молекулен маркер (100 bp). 2, 5, 6 - изолати с идентични RAPD профили от КАИЛ (клъстер G); 10, 11 - изолати с идентични RAPD профили от I пулмология (клъстер O); 1, 3, 4, 7, 8, 9, 12 – 19 - изолати с уникални RAPD профили от различни клиники на УМБАЛ „Света Марина”-Варна.

Дендрограмата, отразяваща степента на сходство на клонално свързаните изолати от УМБАЛ „Света Марина” Варна е представена на фигура 7.

Сред шестте типирани изолати от СБАЛАГ „Проф. Г. Стаматов” Варна, установихме клъстерна група от четири изолата с висок коефициент на сходство (клъстер Q).

Всички изолати от МБАЛ „Света Анна” Варна демонстрираха уникални профили.



Фигура 7. Дендрограма на изолатите *S. maltophilia* от УМБАЛ „Света Марина“ Варна.

Изолатите с уникални профили от клиничен център Варна заеха много голям относителен дял - 70.1% (n=80). Подобни са данните от други сходни проучвания. При проучване, базирано на PFGE и RAPD – PCR, Shauman и колектив установяват голяма разнообразие сред генетичните профили на проучените 96 изолата и липса на епидемично разпространение на определен щам в болничната среда (180). Аналогично, Valdezate и колектив доказват чрез PFGE също висока степен на генетично разнообразие сред 139 клинични изолата *S. maltophilia*, произхождащи от една болница и изолирани за период от 4 години, като отдиференцират 99 различни пулсотипа. Същото проучване идентифицира фибробронхоскопска апаратура като източник на нозокомиално разпространение на *S. maltophilia* сред ограничен брой пациенти, преминали през бронхоскопско

изследване в период от 84 дни. В нашето проучване единственият щам, изолиран от дестилирана вода за овлажнител в Интензивно Детско Отделение – Варна, демонстрира уникален RAPD – профил и поради това бе интерпретиран като генетично неродствен с проучваните общо 10 клинични изолата от същото звено, както и с останалите типирани клинични изолати. Този факт не изключва изцяло възможността това да е източник на вътреболнично разпространение, но отсъствието на генетично сходство с останалите изолати е индикация, че в конкретната ситуация липсва епидемиологична връзка между тях. Такава връзка не бе доказана и при типирането на единствения щам, изолиран при профилактично изследване на медицински персонал от КАИЛ – Варна.

Сред проучваните изолати от трите болници във Варна установихме разпространение на генетично родствени щамове сред пациенти, хоспитализирани в клиники за интензивно лечение. Най - голямата група (група R) бе представена от четири генетично свързани щам (коефициент на сходство 0.92 до 1), изолирани от новородени в интензивно неонатологично отделение на СБАГАЛ «Проф. Д-р Д. Стаматов » през период от двадесет и осем дни. Тази находка вероятно е свързана с момент на кръстосано предаване и / или общ източник в болничната среда.

Интересен е факта, че от общо десетте проучени изолата от пациенти, лекувани в КАИЛ на УМБАЛ „Св. Марина“, само три демонстрираха идентични RAPD – профили (група G). Два от идентичните изолати бяха от трахеални секрети на един пациент, лекуван в клиниката през 2007г., докато третия изолат бе от пациент, хоспитализиран в същата клиника, но през 2010г. В този конкретен случай поради дългия времеви интервал бе отхвърлена възможността за директно кръстосано предаване на щамовете между двамата пациенти. Като възможна бе приета хипотезата за вътреболнично разпространение посредством неидентифициран източник, тъй като санитарно - микробиологичните проучвания не доказаха присъствието на този щам в болничната среда. Подобна находка установихме и при анализа на типирани изолати от Интензивно Детско Отделение, където бе обособена група от два сродни щам (кълъстерна група I), изолирани през интервал от 13 месеца, което

бе определено като трайно персистиране в рамките на клиниката. Сред изолатите от Интензивно Детско Отделение установихме и друга група от три генетично сродни изолата (група N), състояща се от изолат от хранка на пациент, хоспитализиран в клиниката през м. май 2012г. и два изолата от трахеални секрети на пациент, лекуван в същата клиника по същото време. В този случай, на базата на данните от типизирането бе прието, че става въпрос за кръстосано предаване на щама от пациент на пациент, вероятно чрез обслужващия медицински персонал или при употреба на нестерилна медицинска апаратура или инструментариум.

Сред изолатите от УМБАЛ „Св. Марина” - Варна установихме щамове с висока степен на сходство в някои от не-интензивните клиники. От общо седемте изолата от Клиниката по хепатогастроентерология, шест демонстрираха висока степен на генетично сходство и бяха разпределени в две групи от по три щама. Едната от тях (група P) бе съставена от напълно идентични изолати, а другата (група L) – от изолати с коефициент на сходство 0.84 - 0.95. Всички щамове бяха изолирани в хода на рутинно микробиологично изследване от асцитна течност на пациенти с чернодробна цироза с клинични данни за остра бактериална инфекция. Епидемиологичните данни потвърждават едновременното разпространение на два малки епидемични клона за продължителен период от време (03.2011 – 08.2012г.) в рамките на Клиниката. Независимо, че подобни изолати не бяха идентифицирани при изследване на болничната околна среда, остават съмненията за разпространение на тези щамове чрез нестерилни болнични консумативи и/или ръцете на медицинския персонал. В проучената литература не открихме данни за подобно разпространение на клонално свързани щамове сред пациенти с цироза.

Трите изолата от клъстерна група J бяха изолирани от различни пациенти, хоспитализирани в Клиниката по гръдна хирургия през период от една година между 2011 - 2012г. Общият брой на типизираните изолати от тази клиника бе пет, като двата изолата с уникални профили бяха изолирани в различен времеви интервал, предхождащ появата на малкия клон. Предполагаме, че и в този случай продължителното персистиране

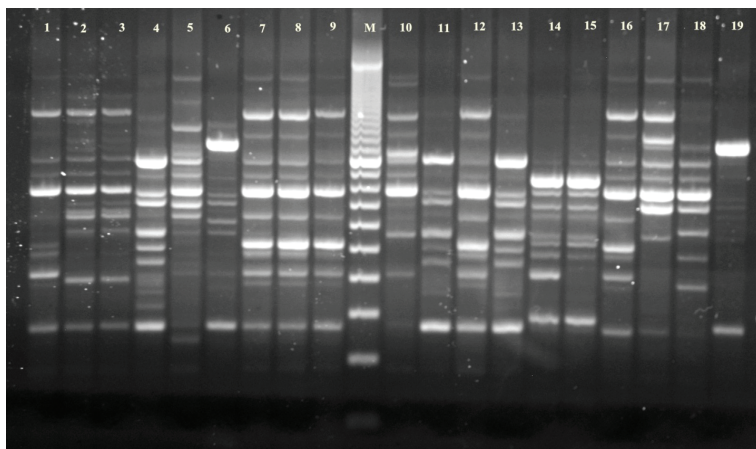
на този клон е свързано с неидентифициран общ източник в болничната среда. Наличието и на уникални изолати обаче доказва, че епидемичното вътреболнично разпространение на *S. maltophilia* не е единствения възможен механизъм за колонизиране и инфекция при този бактериален вид.

Типираните изолати *S. maltophilia* от пациенти с муковисцидоза бяха шест. Само един от тях бе от пациент от интензивна клинична структура – интензивно педиатрично отделение, а всички останали пет изолатата бяха от пациенти, хоспитализирани в Първа детска клиника на УМБАЛ “Света Марина” - Варна. При всички типирани изолати *S. maltophilia* се установиха уникални RAPD профили, което ги определи като генетично неродствени. Подобна находка се обяснява с факта, че първоначалната колонизация при тези пациенти най-често възниква в извънболнична среда, където е и естественото местообитание на *S. maltophilia*. Получените от нас данни потвърждават тези, получени при други автори. Чрез REP PCR и PFGE, Denton и колектив установяват висок относителен дял на генетично неродствени щамове при 33 от изследваните общо 41 пациента с муковисцидоза, колонизирани със *S. maltophilia*. Тъй като същото проучване анализира и степента на генетично сходство между 82 не-клинични изолатата *S. maltophilia* (от болнична среда и извънболнични изолати от домовете на колонизираните пациенти), авторите споделят извода, че при по - голяма част от респираторните изолати от пациенти с муковисцидоза източниците остават неидентифицирани, като се предполага, че те са разнообразни и са локализиращи в или извън болничната среда. Значение за персистирането на *S. maltophilia* в респираторния тракт на тези пациенти вероятно имат и честите антибиотични курсове, които обичайно се прилагат при тях. Положителна корелация между пероралната консумация на антибиотици, най-често провеждана в извънболнични условия (amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, макролиди) и колонизацията със *S. maltophilia* е доказана от H. Alexandrou - Athanasoulis.

Епидемиологично типирание на изолатите от УМБАЛ „Георги Странски” - Плевен.

Сред изолатите от пациенти от УМБАЛ - Плевен ($n = 34$) уникални RAPD профили установихме при 18, а останалите 16 клонално свързани изолати бяха разпределени в шест групи на сходство (A - F), състоящи се от два до пет изолата всяка. Пет клъстерни групи от клонално свързани щамове бяха идентифицирани в интензивните клиники – КАИЛ, САРИЛ и Неонатология.

На фигура 8 са представени RAPD профилите на 19 клинични изолата *S. maltophilia* от УМБАЛ “Георги Странски” - Плевен.



Фигура 8. RAPD профили на 19 клинични изолата *S. maltophilia*, изолирани от интензивните клиники на УМБАЛ “Георги Странски” - Плевен. М – стандартен молекулен маркер (100 bp). 1 до 19 – клинични изолати на пациенти от КАИЛ и САРИЛ при УМБАЛ „Георги Странски” – Плевен. Сходство на изолати № 2 и 3 (клъстер А), № 7, 8, 9, 12 и 16 (клъстер В), № 11 и 13 (клъстер D) и № 14 и 15 (клъстер F).

Информацията за клонално свързаните изолати от Плевен, отнасящи се до дата на изолиране, пол, възраст, вид на клиничния материал и RAPD - профил са представени в таблица 12.

Таблица 12. Характеристики на клонално свързаните изолати *S. maltophilia* от клиничен център Плевен.

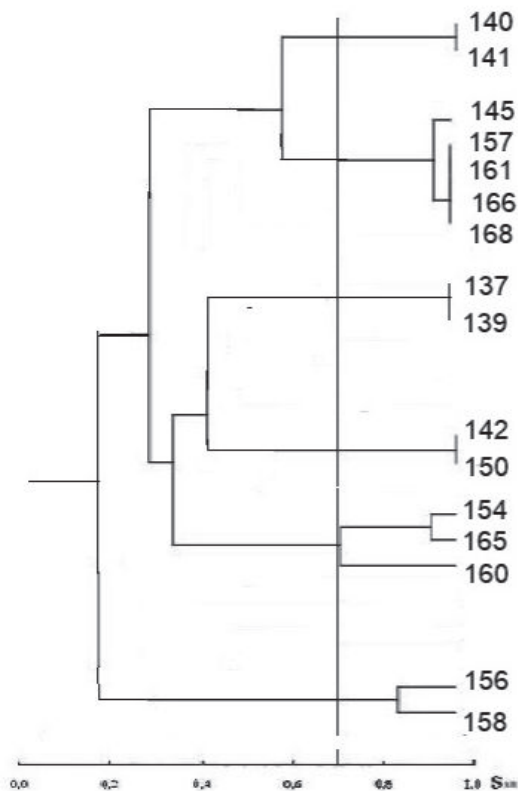
№	Дата на изолане	Възраст	Пол	Клиничен материал	Отделение	RAPD
140	20.03.2007	74	м	трахеален секрет	КАИЛ	A
141	28.03.2007	19	ж	трахеален секрет	КАИЛ	A
145	6.12.2007	16	м	трахеален секрет	САРИЛ	B
157	29.06.2009	65	ж	трахеален секрет	КАИЛ	B
161	15.02.2010	41	ж	трахеален секрет	КАИЛ	B
166	29.06.2010	46	м	рана	САРИЛ	B
168	18.11.2010	72	м	трахеален секрет	КАИЛ	B
137*	12.09.2007	78	м	урина	амбулатория	C
139*	2.10.2007	78	м	урина	амбулатория	C
142	14.11.2007	16	м	трахеален секрет	САРИЛ	D
150	19.10.2008	55	м	трахеален секрет	САРИЛ	D
154	25.02.2009		м	трахеален секрет	САРИЛ	E
165	9.06.2010	61	ж	трахеален секрет	САРИЛ	E
160	29.10.2010	27	м	урина	Урология	E
156	5.06.2009	0		трахеален секрет	Неонатология	F
158	28.09.2009	0		трахеален секрет	Неонатология	F

*изолати № 137 и 139 са изолирани от един пациент и са с идентичен RAPD – профил

Дендрограмата, отразяваща степента на сходство на изолатите от клиничен център Плевен е представена на фигура 8.

Анализът на данните от епидемиологичното типичане на изолатите от клиничен център Плевен показва, че над половината от тях – 52.1% (18 изолата), генерираха уникални RAPD профили. На базата на тези резултати щамовете бяха интерпретирани като епидемиологично несвързани и съответно при тези пациенти се прие като най-вероятна хипотезата за заразяване извън болничната среда. *S. maltophilia* е микроорганизъм, широко разпространен в околната среда, често изолиран от множество източници като почва, различни растителни видове, хранителни продукти, вода от природни водоеми и др. От друга страна, редица специфични биологични характеристики на *S. maltophilia*, правят възможно лесното му адаптиране към различни местообитания. Поради тази причина се счита, че колонизацията на пациентите в извънболнични условия е много вероятна. При подходящи условия като например селективен антибиотичен натиск, прилагане на инвазивни диагностични и терапевтични процедури

и / или наличие на тежки придружаващи заболявания, предшестващата колонизация би могла да се асоциира с повишен риск от развитие на клинично проявена инфекция. Макар да е трудно тази хипотеза да бъде реално доказана поради практическата невъзможност да се установи епидемиологична връзка между свободно живеещи изолати от околната среда и патогените, изолирани в хоспитализирани пациенти, тя е много вероятна и би обяснила високата степен на генетично разнообразието в болничните структури.



Фигура 8. Дендрограма на изолатите *S. maltophilia* от УМБАЛ „ Георги Странски ” - Плевен.

Сред проучените клонално свързани изолати от този клиничен център се оформиха общо 6 групи на сходство, едната, от които бе представена от два идентични изолати *S. maltophilia* от урина на пациент с карцином на простатата и траен уринарен катетър, изолирани през интервал от един месец (група С). В последния случай бе установено, че става въпрос за колонизация и/или инфекция с един щам, персистиращ за продължителен период от време. Тази находка не е необичайна, тъй като е известно, че *S. maltophilia* макар и рядко се асоциира с комплицирани уроинфекции, обикновено при пациенти със структурни аномалии на отделителната система. В нашите данни липсва информация за провеждана специфична антибиотична терапия при конкретния пациент и в този смисъл не бихме могли да обвържем трайното персистиране на щамата с клиничен неуспех заради евентуална дисоциация между определена *in vitro* и реалната, *in vivo* чувствителност към антибактериални препарати. Всички останали типирани изолати от клиничен център Плевен бяха от различни пациенти, хоспитализирани в клиники на УМБАЛ „Георги Странски“. На практика, всички тези клонално свързани щамове бяха изолирани от пациенти, хоспитализирани в отделения за интензивно лечение – КАИЛ, САРИЛ и Неонатология. Най - многобройната група (група В), състояща се от пет генетично родствени щамата *S. maltophilia* (с висок коефициент на сходство между 0.94 и 1.0), бе съставена от изолати от пациенти, лекувани в КАИЛ и САРИЛ за период от три години – от 2007 до 2010г. Доказването на сродни и/или идентични щамове *S. maltophilia* за дълъг период от време в пациенти в две отделни клинични звена предполага наличие на общ източник в болничната среда. Такъв източник не бе установен в настоящото проучване. Установяването на два идентични щамата *S. maltophilia* от трахеални секрети на пациенти в КАИЛ (група А) през кратък период от време – 8 дни, бе интерпретирано като възможен епизод на кръстосано предаване. Подобно разпространение в условията на клиники за интензивно лечение обикновено се свързва с директно предаване чрез ръцете на медицинския персонал и / или работа с нестерилни медицински консумативи и инструментариум.

В заключение, основният извод от извършеното чрез RAPD PCR епидемиологично типичане е, че по – голяма част от проучените клинични изолати *S. maltophilia* са генетично неродствени, което предполага, че в повечето случаи се касае за заразяване на пациентите от множество

различни източници, вероятно извън болничните екосистеми. В този смисъл препоръчваме като уместно скрининговото микробиологично изследване при хоспитализиране, особено в интензивните клиники, с оглед ранна детекция и превенция на разпространението на *S. maltophilia* в болничната среда. Макар и относително рядко, клонално свързани щамове се изолират, като тяхната честота е по-висока в звената за интензивно лечение в сравнение с не-интензивните клиники. Прилагането на подходящи противоепидемични мерки в тези болнични структури би редуцирало възможността за разпространение на този микроорганизъм, чието лечение е особено проблематично и нерядко свързано със значителни разходи.

5. ИЗВОДИ

1. Инвазивните инфекции, асоциирани със *S. maltophilia* често се установяват при пациенти с допълнителни рискови фактори като например малигнени хемопатии, хроничен диализ и др.
2. Налице е пълна съпоставимост между класическите и апаратните методи за видова идентификация на *S. maltophilia*. Съществено предимство на автоматизираната система Phoenix е краткият срок на идентификацията (средно 2ч. и 30мин.), което съществено подпомага избора на подходяща антимикробна терапия.
3. Чувствителността на клиничните изолати *S. maltophilia* е най-висока спрямо глицилциклиновия препарат tigecycline (98%). Tigecycline, следван от trimethoprim / sulfamethoxazole (96%) и doxycycline (93. %), както и комбинациите на trimethoprim/ sulfamethoxazole с ticarcillin / clavulanic acid и на levofloxacin с ceftazidime са сред най-добрите терапевтични възможности за лечение на *S. maltophilia* - асоциирани инфекции.
4. Дисково - дифузионният метод е неподходящ за лабораторното определяне на чувствителността на *S. maltophilia* към антимикробни препарати (с изключение на trimethoprim/sulfamethoxazole).
5. Е - тестът е съизмерим с еталонните методи за определяне на *in vitro* чувствителността на *S. maltophilia*.
6. Резистентността на *S. maltophilia* към trimethoprim / sulfamethoxazole се кодира от *sul 1* гена, кодиращ синтеза на форми на дихидроптероат синтетаза, нечувствителна към действието на препарата.
7. Резистентността към trimethoprim/ sulfamethoxazole при *S. maltophilia* се асоциира с множествена резистентност към различни неродствени класове антимикробни препарати (ticarcillin/clavulanic acid, ceftazidime, полимиксини, хинолони), като вероятно този феномен е свързан с локализиране на *sul 1* гена в състава на генни касети, съдържащи допълнителни гени, кодиращи резистентност към други антибиотични групи и/

или свръхекспресия на някои от ефлуксните помпи, типични за вида.

8. При значителен процент от изолатите *S. maltophilia* (над 50%) се демонстрира синергистичен ефект при комбинирането на trimethoprim/sulfametoxazole и levofloxacin с бета - лактамни препарати като ticarcillin/clavulanic acid и ceftazidime. Това дава основание тези комбинации да бъдат препоръчани за лечение на тежки инфекции, причинени от *S. maltophilia*.
9. Не се доказва разпространение на гени, кодиращи ESBLs, а се установи присъствието единствено на гените, кодиращи вродените бета-лактамази (L1, L2), характерни за вида, като те са експресирани в различна степен. В този смисъл *S. maltophilia* не може да се разглежда като резервоар за ESBL гени.
10. Доказа се голямо генетично разнообразие сред типиранияте изолати *S. maltophilia* (в 70.9%). Идентифицираха се 16 малки кластера, състоящи се от 2 до 5 идентични или близко родствени изолати *S. maltophilia*. Не се установи доминиране на определен клон *S. maltophilia* в съответните клинични центрове през проучвания период от време.

6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. Представени са обобщени данни за чувствителността към антимикробни лекарствени средства и бета - лактамазната продукция на голяма колекция от клинични изолати *S. maltophilia*, изолирани за период от 8 години в 4 болнични центъра в България.
2. Извършени са сравнителни проучвания върху чувствителността на *S. maltophilia* към антибиотици според типа отделение и вида на клиничния материал.
3. Като механизъм на резистентност към trimethoprine/sulfamethoxazole сред клиничните изолати *S. maltophilia* е доказан гена *sul 1*, отговорен за синтеза на форми на дихидроптероат синтетаза, нечувствителна към въздействието на препарата.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е ниската специфичност на двойно - дисковия тест за синергизъм за детекция на гени, кодиращи широкоспектърни бета - лактамази, различни от хромозомно кодираните сред изолатите *S. maltophilia*.
2. Потвърдена е недостатъчната акуратност на дисково - дифузионния тест при определяне на чувствителността на *S. maltophilia* към антимикробни лекарствени средства.

Приноси с научно - приложен характер

1. Оценени са възможностите на автоматизираната система Phoenix 100 за идентифициране на *S. maltophilia* и е извършен сравнителен анализ между класическите и апаратните методи за идентификация.
2. Изпитана е чувствителността на *S. maltophilia* към новия за клиничната практика антибиотик tigecycline, както и към colistin - едни от малкото препарати с активност срещу множествено резистентни Грам - отрицателни бактерии.
3. Проучени са възможностите за комбинирано приложение на антимикробни лекарствени средства в случаите на лечение на тежки инфекции, причинени от *S. maltophilia* и са направени съответните препоръки за това.
4. Проучена е епидемиологията на голяма колекция от изолати *S. maltophilia*, получени от клинични материали на хоспитализирани пациенти чрез молекулярно - генетичния метод RAPD PCR.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.

Публикации в научни списания

1. **М. Божкова**, Т. Стоева, К. Божкова. Терапевтични стратегии при асоциираните със *Stenotrophomonas maltophilia* респираторни инфекции при хоспитализирани пациенти. *Медицински преглед* 2013, 49, № 3, 50-56.
2. **М. Bojkova**, R. Markovska, T. Stoeva, T. Strateva, D. Ivanova, V. Popova, I. Mitov. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* in a Bulgarian University Hospital over a 5-year period (2007 - 2012). *Scand J Infect Dis* 2015, 47: 932-934 (**IF 1.49**).
3. **М. Божкова**, Т. Стоева, Р. Марковска, К. Божкова, И. Митов. In vitro активност на антибиотични комбинации срещу клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*. *Медицински преглед*, 2015, 51, №5, 33-37.

Съобщения, изнесени на научни форуми

1. **М. Божкова**, Р. Марковска, Т. Стратева, Т. Стоева, Д. Иванова, М. Средкова, К. Божкова, И. Митов. Молекулярно – епидемиологично проучване на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*, изолирани в български болници. 11 Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекциозни болести, София, 9 – 11 Май, 2013.:30.
2. **М. Bojkova**, T. Stoeva, R. Markovska, D. Ivanova, K. Bojkova, I. Mitov. R203 Publication Only Antimicrobials: Epidemiology of MDR-Gram-negatives: Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* in a Bulgarian hospital over a 5-year period (2007 – 2012). Barcelona 2014, 24 ECCMID 10 – 13 May 2014. R203 (publication only)